

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر-

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE (ENSA)

E1 - HARRACH – ALGER



Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Thème

**Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne
et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux
Lamiaceae**

Présentée par : Melle AIT CHAUCHE Ferial Sabrine

Soutenue le : 01/07/2018

Devant le jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Président : | Mme. Doumandji-Mitiche B. | Professeur à l'ENSA |
| Directeur de thèse : | Mme. Mouhouche F. | Professeur à l'ENSA |
| Co-directeur de thèse: | Mr. Hazzit M. | Professeur à l'ENSA |
| Examineurs : | Mme. Guenafdi-Yahi N. | Professeur à l'USTHB |
| | Mme. Sahir-Halouane F. | Professeur à l'UMBB |
| | Mr. Ait Ouazzou A. | MCA à l'UA1 |

Remerciements

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciements et louanges à Allah tout puissant, qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à ma directrice de thèse, Madame **Mouhouche Fazia**, Professeur à l'ENSA, pour son sérieux, sa patience, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et l'orientation dont j'ai pu bénéficier et sans qui cette thèse n'aurait jamais vue le jour.*

*Mes plus profonds remerciements s'adressent à Monsieur **Hazzit Mohamed**, Professeur à l'ENSA, pour sa gentillesse, son aide, ses encouragements et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Madame **Doumandji-Mitiche Bahia**, Professeur à l'ENSA, d'avoir accepté d'honorer la présidence du jury.*

*Un grand remerciement à Madame **Guenafdi-Yahi Nassima**, Professeur à l'USTHB, de m'avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*J'exprime toute ma gratitude à Madame **Sahir-Halouane Fatma**, Professeur à l'UMBB, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.*

*De même, j'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **Ait Ouazzou Abdenour**, Maître de conférences classe A à l'UA1, pour avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier chaleureusement **Professeur Ferradji Ali** pour mon accueil au sein de son laboratoire, son aide précieuse, sa confiance et ses conseils.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Melle **Belhachat Djamila**, Mr. **Boukhari Nabil** et Dr. **Hadjadj Naima** pour leurs écoutes, leurs aides et les agréables moments que nous avons passés ensemble.*

J'associe mes remerciements à l'ensemble du personnel du département de Technologie Alimentaire, de Zoologie Agricole, de Botanique et de Zootechnie pour leur gentillesse et leur écoute.

Je remercie le personnel du CRD Saidal pour leur aide précieuse.

Je tiens aussi à remercier le personnel du Département de chimie industrielle de l'Université de Blida pour leur aide.

Enfin, j'exprime mes affectueuses pensées à mes parents et à mes frères qui m'ont soutenus et encouragés tout au long de mes études.

" Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. "

Marcel Proust

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction 1

1^{ère} PARTIE : Etude bibliographique

Chapitre I : Huiles essentielles et composés phénoliques 5

1.1. Huiles essentielles.....5

1.1.1. Définition.....5

1.1.2. Le marché mondial des huiles essentielles.....6

1.1.3. Propriétés physico-chimiques6

1.1.4. Composition chimique 7

1.1.4.1. Les terpènes.....7

1.1.4.2. Composés aromatiques8

1.1.4.3. Composés d'origine diverses.....8

1.1.4.4. Notion de chémotype.....8

1.1.5. Les techniques d'extraction des huiles essentielles.....8

1.1.5.1. Extraction par hydrodistillation.....8

1.1.5.2. Entraînement à la vapeur d'eau9

1.1.5.3. L'expression à froid9

1.1.5.4. Extraction au CO₂ supercritique.....10

1.1.5.5. Hydrodistillation par micro-ondes sous vide10

1.1.5.6. Extraction assistée par ultrasons.....11

1.1.5.6.1. Principe.....11

| | |
|--|-----------|
| 1.1.5.6.2. Effet des paramètres opératoires..... | 12 |
| 1.1.5.7. L'enfleurage..... | 13 |
| 1.1.5.7.1. L'enfleurage à froid..... | 13 |
| 1.1.5.7.2. L'enfleurage à chaud..... | 14 |
| 1.1.6. Facteurs influençant la composition..... | 14 |
| 1.1.7. Méthodes d'identification des huiles essentielles..... | 14 |
| 1.1.7.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)..... | 14 |
| 1.1.7.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM) | 15 |
| 1.1.8. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles..... | 16 |
| 1.1.9. Propriétés biologiques des huiles essentielles..... | 16 |
| 1.1.9.1. Propriétés antioxydantes | 16 |
| 1.1.9.2. Propriétés antibactériennes et antifongiques | 17 |
| 1.1.9.3. Propriétés insecticides..... | 17 |
| 1.1.10. Mode d'action des huiles essentielles..... | 17 |
| 1.1.11. Critère de qualité..... | 18 |
| 1.1.12. Toxicité des huiles essentielles..... | 19 |
| 1.1.13. Méthodologie des surfaces de réponse..... | 20 |
| 1.1.13.1. Utilisation de la méthodologie des surfaces de réponse pour l'optimisation de l'extraction des huiles essentielles..... | 20 |
| 1.2. Composés phénoliques..... | 21 |
| 1.2.1. Définition | 21 |
| 1.2.2. Biosynthèse des polyphénols..... | 21 |
| 1.2.3. Classification des composés phénoliques | 21 |
| 1.2.3.1. Les acides phénoliques..... | 22 |
| 1.2.3.2. Les flavonoïdes..... | 24 |
| 1.2.3.2.1. Structure et classification des flavonoïdes..... | 24 |
| 1.2.3.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes..... | 25 |
| 1.2.3.1.3. Les tanins..... | 25 |
| 1.2.4. Biodisponibilité des composés phénoliques..... | 26 |
| 1.2.5. Activités biologiques des composés phénoliques..... | 26 |
| Chapitre II : Monographie des espèces étudiées | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 1.1. Famille des Lamiaceae..... | 29 |
| 1.2. <i>Mentha pulegium</i> L..... | 30 |
| 1.2.1. Aspects botaniques..... | 30 |
| 1.2.2. Position systématique..... | 31 |
| 1.2.3. Aires de répartition..... | 31 |
| 1.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle..... | 32 |
| 1.3. <i>Teucrium polium</i> L..... | 33 |
| 1.3.1. Description botanique..... | 34 |
| 1.3.2. Position systématique..... | 35 |
| 1.3.2. Air de répartition..... | 35 |
| 1.3.4. Utilisations en médecine traditionnelle..... | 35 |
| 1.3.5. Composition chimique de <i>Teucrium polium</i> | 36 |
| Chapitre III : Activité antioxydante | 38 |
| 3.1. Stress oxydant..... | 38 |
| 3.2. Les radicaux libres..... | 39 |
| 3.3. Les antioxydants..... | 39 |
| 3.3.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)..... | 40 |
| 3.3.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)..... | 40 |
| 3.4. Mécanismes d'action des antioxydants..... | 41 |
| Chapitre IV : Activité antimicrobienne | 43 |
| 4.1. Généralités..... | 43 |
| 4.2. Culture des bactéries..... | 43 |
| 4.3. Les antibiotiques..... | 44 |
| 4.3.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques..... | 44 |
| 4.3.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide..... | 45 |
| 4.3.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques..... | 45 |
| 4.3.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits..... | 46 |
| 4.5. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles | 48 |
| 4.5.1. Activité liée à la composition chimique | 48 |
| 4.5.2. Activité liée au micro-organisme | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro | 49 |
| 4.6.1. Techniques de screening des huiles essentielles | 50 |
| 4.6.1.1. Aromatogramme | 50 |
| 4.6.1.2. Technique de diffusion en puits | 50 |
| 4.6.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles | 50 |
| 4.6.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide | 50 |
| 4.6.2.2. Techniques de diffusion en milieu liquide | 51 |
| 4.6.2.2.1. Test de microdilution | 51 |
| 4.6.2.2.2. Test de macrodilution | 51 |
| 4.6.2.3. Techniques de diffusion en phase vapeur | 51 |
| 4.6.2.3.1. Méthode des micro-atmosphères | 51 |
| Chapitre V : Présentation du modèle d'insecte étudié..... | 52 |
| 5.1. Position systématique..... | 52 |
| 5.2. Description..... | 53 |
| 5.3. Cycle de développement..... | 54 |
| 5.4. Dégâts causés par <i>Callosobruchus maculatus</i> | 55 |
| 5.5. Méthodes de lutte contre les insectes des denrées stockées..... | 56 |
| 5.5.1. Lutte chimique..... | 56 |
| 5.5.2. Lutte physique et mécanique..... | 57 |
| 5.5.3. Lutte biologique..... | 58 |

2^{ème} PARTIE : Etude expérimentale

| | |
|---|-----------|
| Chapitre I : Matériel et méthodes..... | 60 |
| 1.1. Matériel végétal..... | 60 |
| 1.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation assistée par ultrasons..... | 60 |
| 1.2.1. Protocole d'extraction..... | 60 |
| 1.2.2. Récupération, séchage et conservation des huiles essentielles..... | 62 |
| 1.2.3. Optimisation par la méthode des surfaces de réponse..... | 62 |
| 1.2.4.1. Analyse statistique des données..... | 63 |
| 1.3. Elaboration des extraits non volatils..... | 64 |
| 1.3.1. Principe..... | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.2. Mode opératoire..... | 64 |
| 1.4. Analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles..... | 65 |
| 1.4.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)..... | 65 |
| 1.4.1.1. Principe..... | 65 |
| 1.4.1.2. Mode d'identification..... | 65 |
| 1.4.2. Analyse semi-quantitative des huiles essentielles par CG/SM..... | 66 |
| 1.5. Dosage des composés phénoliques des extraits obtenus..... | 66 |
| 1.5.1. Dosage des phénols totaux..... | 66 |
| 1.5.1.1. Principe..... | 66 |
| 1.5.1.2. Mode opératoire..... | 67 |
| 1.5.2. Dosage des flavonoïdes..... | 67 |
| 1.5.2.1. Principe..... | 67 |
| 1.5.2.2. Mode opératoire..... | 67 |
| 1.6. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 68 |
| 1.6.1. Activité de piégeage du radical 2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl (DPPH)..... | 68 |
| 1.6.1.1. Principe..... | 68 |
| 1.6.1.2. Mode opératoire..... | 69 |
| 1.6.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC ₅₀)..... | 69 |
| 1.6.2. Activité de piégeage du radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acide (ABTS ^{•+})..... | 69 |
| 1.6.2.1. Principe..... | 69 |
| 1.6.2.2. Mode opératoire..... | 70 |
| 1.6.3. Mesure du pouvoir réducteur..... | 71 |
| 1.6.3.1. Principe..... | 71 |
| 1.6.3.2. Mode opératoire..... | 71 |
| 1.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne..... | 72 |
| 1.7.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien..... | 72 |
| 1.7.1.1. Principe..... | 72 |
| 1.7.1.2. Micro-organismes testés..... | 73 |
| 1.7.1.3. Protocole expérimental..... | 74 |
| 1.7.1.3.1. Préparation de la première couche du milieu..... | 74 |
| 1.7.1.3.2. Préparation de l'inoculum..... | 74 |
| 1.7.1.3.3. Préparation de la deuxième couche du milieu..... | 74 |

| | |
|---|-----------|
| 1.7.1.3.4. Les huiles essentielles et les extraits utilisés..... | 74 |
| 1.7.1.3.5. Dépôt des disques..... | 75 |
| 1.7.1.3.6. Lecture des résultats..... | 75 |
| 1.7.2. Etude quantitative : détermination de la CMI et CMB | 75 |
| 1.7.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 75 |
| 1.7.2.1.1. Principe..... | 75 |
| 1.7.2.1.2. Protocole expérimental..... | 76 |
| 1.7.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)..... | 77 |
| 1.7.2.2.1. Principe..... | 77 |
| 1.7.2.2.2. Protocole expérimentale..... | 77 |
| 1.8. Evaluation de l'activité insecticide..... | 77 |
| 1.8.1. Matériel biologique..... | 77 |
| 1.8.1.1. Matériel végétal | 77 |
| 1.8.1.2. Matériel entomologique..... | 78 |
| 1.8.2. Choix des doses..... | 78 |
| 1.8.3. Choix du solvant | 79 |
| 1.8.4. Essais de toxicité des huiles essentielles et des extraits sur <i>Callosobruchus maculatus</i> | 79 |
| 1.8.4.1. Evaluation de la toxicité par contact..... | 80 |
| 1.8.4.2. Evaluation de la toxicité par inhalation..... | 80 |
| 1.8.5. Détermination de l'effet des doses sublétales des huiles essentielles sur la fécondité..... | 82 |
| 1.8.5.1. Principe..... | 82 |
| 1.8.6. Détermination de l'effet des doses sublétales des huiles essentielles sur la fertilité..... | 82 |
| 1.8.7. Expression des résultats..... | 82 |
| 1.9. Analyse statistique..... | 83 |
| Chapitre II : Résultats et discussion..... | 84 |
| 2.1. Optimisation du rendement d'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées par hydrodistillation assistée par ultrasons en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse..... | 84 |
| 2.1.1. Menthe pouliot..... | 84 |
| 2.1.1.1. Ajustement du modèle..... | 84 |
| 2.1.1.2. Analyse des Surfaces de réponse..... | 87 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.2. Germandrée tomenteuse..... | 90 |
| 2.1.2.1. Ajustement du modèle..... | 90 |
| 2.1.2.2. Analyse des surfaces de réponse..... | 92 |
| 2.2. Effet du type de solvant sur le rendement d'extraction des plantes étudiées..... | 94 |
| 2.3. Evaluation de la composition chimique des huiles essentielles..... | 95 |
| 2.3.1. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle de la menthe pouliot..... | 96 |
| 2.3.2. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle de la germandrée tomenteuse..... | 101 |
| 2.4. Teneur en polyphénols des extraits obtenus par les différents solvants..... | 105 |
| 2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits étudiés..... | 108 |
| 2.5.1. Activité de piégeage du radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)..... | 109 |
| 2.5.1.1. Cas des huiles essentielles..... | 109 |
| 2.5.1.2. Cas des extraits..... | 112 |
| 2.5.2. Activité de piégeage du radical 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS ^{•+})..... | 115 |
| 2.5.2.1. Cas des huiles essentielles..... | 116 |
| 2.5.2.2. Cas des extraits..... | 117 |
| 2.5.3. Pouvoir réducteur..... | 120 |
| 2.5.3.1. Cas des huiles essentielles..... | 121 |
| 2.5.3.2. Cas des extraits..... | 122 |
| 2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne..... | 125 |
| 2.6.1. Etude qualitative des huiles essentielles et des extraits testés..... | 125 |
| 2.6.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées..... | 125 |
| 2.6.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits testés..... | 130 |
| 2.6.2. Etude quantitative des huiles essentielles et des extraits testés..... | 135 |
| 2.6.2.1. Détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles examinées..... | 135 |
| 2.6.2.2. Détermination de la CMI et de la CMB des extraits examinés..... | 137 |
| 2.7. Evaluation de l'activité insecticide..... | 141 |
| 2.7.1. Test de la toxicité des huiles essentielles sur les adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> par contact..... | 141 |
| 2.7.2. Evaluation de la toxicité des différents extraits testés sur les adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> par contact..... | 146 |
| 2.7.3. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles testées par inhalation..... | 151 |

| | |
|---|-----|
| 2.7.4. Effet des huiles essentielles sur la fécondité des femelles de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 154 |
| 2.7.5. Effet des huiles essentielles sur l'éclosion des œufs de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 158 |
| 2.7.6. Effet des huiles essentielles sur l'émergence des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 160 |
| Conclusion | 162 |
| Références bibliographiques | 164 |
| Annexes | 203 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Classe des composés phénoliques dans les plantes | 22 |
| Tableau 2 : Structure des acides hydroxybenzoïques | 23 |
| Tableau 3 : Structure des acides hydroxycinnamique | 23 |
| Tableau 4 : Composition chimique d'huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> de la littérature de différentes origines | 33 |
| Tableau 5 : Quelques exemples de composés isolés des extraits de <i>Teucrium polium</i> | 37 |
| Tableau 6 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées | 42 |
| Tableau 7 : Les niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan de Box-Behnken | 64 |
| Tableau 8 : Forme générale des résultats de l'analyse de la variance..... | 63 |
| Tableau 9 : Caractéristiques des souches microbiennes testées | 73 |
| Tableau 10 : Type d'inhibition des souches microbienne en fonction des diamètres de la zone d'inhibition. | 75 |
| Tableau 11 : Les doses choisies pour chaque huile essentielle et extrait..... | 79 |
| Tableau 12 : Le plan expérimental de Box-Behnken et les valeurs des réponses observées pour l'huile essentielle de la menthe pouliot | 85 |
| Tableau 13 : Le plan expérimental de Box-Behnken et les valeurs des réponses observées de l'huile essentielle de la germandrée..... | 91 |
| Tableau 14 : Rendements d'extraction (% (g/g)) de la menthe pouliot et la germandrée..... | 95 |
| Tableau 15 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle de la menthe pouliot..... | 98 |
| Tableau 16 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle de la germandrée..... | 102 |
| Tableau 17 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> | 107 |
| Tableau 18 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> | 108 |
| Tableau 19 : L'IC ₅₀ des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et <i>Teucrium polium</i> et du BHT | 110 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 20: L'IC ₅₀ des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et <i>Teucrium polium</i> et du Trolox | 116 |
| Tableau 21 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> | 136 |
| Tableau 22 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> | 138 |
| Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> | 140 |
| Tableau 24 : Évolution de la mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> en fonction du temps et des doses d'extraits de <i>Mentha pulegium</i> par contact | 147 |
| Tableau 25 : Évolution de la mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> en fonction du temps et des doses d'extraits de <i>Teucrium polium</i> par contact..... | 150 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Phénomènes de cavitation acoustique | 12 |
| Figure 2 : Structure générale du noyau des flavonoïdes | 24 |
| Figure 3 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes | 25 |
| Figure 4 : <i>Mentha pulegium</i> L..... | 31 |
| Figure 5 : Feuilles et fleurs de <i>Teucrium polium</i> L..... | 34 |
| Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques..... | 46 |
| Figure 7 : Adulte de <i>C. maculatus</i> avec ses différentes parties | 53 |
| Figure 8 : Cycle de développement de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 54 |
| Figure 9 : Bain à ultrasons | 61 |
| Figure 10 : Formule chimique de l'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) | 66 |
| Figure 11 : Formule chimique de la quercétine | 67 |
| Figure 12 : Forme libre (violette) et réduite (jaune) du DPPH | 68 |
| Figure 13 : Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) | 70 |
| Figure 14 : Schéma du protocole expérimental de l'évaluation du pouvoir réducteur | 72 |
| Figure 15 : Principe de la méthode de diffusion sur disques | 73 |
| Figure 16 : L'élevage de masse des insectes dans des bocaux en verre placés dans une étuve réglée à une température de 28 ± 2 °C et une humidité relative de 70 ± 5 %..... | 78 |
| Figure 17 : Effet de l'inhalation des huiles essentielles sur les insectes | 81 |
| Figure 18 : Surfaces de réponse 3D et tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> en fonction, (a) du temps d'extraction et de la puissance ultrasonique, (b) du temps d'extraction et du rapport matière végétale/eau, (c) de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau | 88 |
| Figure 19 : Formation d'une bulle de cavitation et libération du matériel végétal | 90 |
| Figure 20 : Surfaces de réponse 3D et tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> en fonction, (a) du temps d'extraction et de la puissance ultrasonique, (b) du temps d'extraction et du rapport matière végétale/eau, (c) de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau..... | 93 |

| | |
|--|-----|
| Figure 21 : Chromatogramme totale (CG/SM) de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> | 97 |
| Figure 22 : Chromatogramme partiel agrandie (CG/SM) de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> | 97 |
| Figure 23 : Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> | 96 |
| Figure 24 : Répartition en pourcentage des différentes classes chimiques composant l'huile essentielle de la menthe pouliot | 99 |
| Figure 25 : Chromatogramme (CG/SM) de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> | 101 |
| Figure 26 : Répartition en pourcentage des différentes classes chimiques composant l'huile essentielle de la germandrée | 104 |
| Figure 27 : Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> | 104 |
| Figure 28 : Activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> et du BHT | 109 |
| Figure 29 : Activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> et du BHT | 112 |
| Figure 30 : L'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> et du BHT | 113 |
| Figure 31 : Activité de piégeage su radical DPPH des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> et du BHT | 114 |
| Figure 32 : L'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> et du BHT | 115 |
| Figure 33 : Activité de piégeage du radical ABTS ^{•+} des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> | 116 |
| Figure 34 : Activité de piégeage du radical ABTS ^{•+} des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> et du Trolox..... | 118 |
| Figure 35 : L'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> et du Trolox | 119 |
| Figure 36 : Activité de piégeage su radical ABTS ^{•+} des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> et du Trolox. | 119 |
| Figure 37 : L'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> et du Trolox | 120 |
| Figure 38 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> et du BHT..... | 121 |
| Figure 39 : Pouvoir réducteur des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> et du BHT | 123 |
| Figure 40 : Pouvoir réducteur des différents extraits de <i>Teucrium polium</i> et du BHT..... | 124 |

| | |
|---|-----|
| Figure 41 : Zones d'inhibition des souches testées produites par les huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> | 126 |
| Figure 42 : Zones d'inhibition des souches testées produites par les différents extraits de <i>Mentha pulegium</i> | 131 |
| Figure 43: Zones d'inhibition sur toutes les souches testées produites par les différents extraits de <i>Teucrium polium</i> | 133 |
| Figure 44 : Évolution du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> en fonction du temps et des doses d'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> par contact | 142 |
| Figure 45 : Doses sublétales et létales de l'huile essentielle de la menthe pouliot | 150 |
| Figure 46 : Évolution du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> en fonction du temps et des doses d'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> par contact..... | 145 |
| Figure 47: Doses sublétales et létales de l'huile essentielle de la germandrée | 146 |
| Figure 48 : Doses sublétales et létales des extraits de <i>Mentha pulegium</i> | 148 |
| Figure 49: Doses sublétales et létales des extraits de <i>Teucrium polium</i> | 151 |
| Figure 50: Évolution dans le temps du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> traités avec l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> par inhalation | 151 |
| Figure 51 : TL ₅₀ et TL ₉₀ obtenus à partir des tracés des droites de régression de l'essai inhalation de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> à l'égard de <i>C. maculatus</i> | 152 |
| Figure 52 : Évolution dans le temps du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> traités avec l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> par inhalation..... | 153 |
| Figure 53 : TL ₅₀ et TL ₉₀ obtenus à partir des tracés des droites de régression de l'essai inhalation de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> à l'égard de <i>C. maculatus</i> | 154 |
| Figure 54 : Évolution dans le temps de la fécondité des femelles dans le lot témoin et dans les lots traités à la DL ₃₀ d'huiles essentielles | 155 |
| Figure 55 : Nombre d'œufs moyen pondus par femelle durant sa vie dans le lot témoin et les lots traités à la DL ₃₀ d'huiles essentielles | 155 |
| Figure 56 : Évolution dans le temps de la fécondité des femelles dans le lot témoin et dans les lots traités à la DL ₅₀ d'huiles essentielles | 156 |

| | |
|---|-----|
| Figure 57 : Nombre d'œufs moyen pondus par femelle durant sa vie dans le lot témoin et les lots traités à la DL ₅₀ d'huiles essentielles | 156 |
| Figure 58 : Taux d'éclosion moyen des œufs dans les lots témoins et les lots traités aux DL ₃₀ et DL ₅₀ d'huiles essentielles | 159 |
| Figure 59 : Pourcentage moyen d'émergence des adultes dans les lots témoins et les lots traités aux DL ₃₀ et DL ₅₀ d'huiles essentielles | 160 |

Liste des tableaux, annexes

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle quadratique de surface de réponse du rendement d'extraction de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> | 203 |
| Tableau 2 : L'analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique de surface de réponse du rendement d'extraction de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> | 204 |
| Tableau 3 : Etudes antérieures des principaux constituants des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> dans plusieurs pays et régions d'Algérie..... | 205 |
| Tableau 4 : Etudes antérieures des principaux constituants des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i> dans le monde et plusieurs régions d'Algérie..... | 207 |
| Tableau 5 : Analyse statistique des activités biologiques étudiées par le test de Shapiro-Wilks..... | 215 |

Liste des figures, annexes

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 208 |
| Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine..... | 209 |
| Figure 3 : Activité de piégeage du radical ABTS ^{•+} par le Trolox..... | 209 |
| Figure 4: Zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Escherichia Coli</i> | 210 |
| Figure 5: Zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> | 210 |
| Figure 6: Zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Candida albicans</i> | 210 |
| Figure 7: Zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Candida albicans</i> | 211 |
| Figure 8: Zones d'inhibition des extraits de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> | 211 |
| Figure 9: Zones d'inhibition des extraits de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Teucrium polium</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 211 |
| Figure 10: Illustration de la CMI de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées..... | 212 |
| Figure 11 : Illustration de la CMI de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> | 212 |
| Figure 12 : Illustration de la CMI de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> | 213 |

| | |
|---|-----|
| Figure 13: Illustration de la CMI de l'extrait hexane de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées..... | 213 |
| Figure 14: Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique de <i>Teucrium polium</i> vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées..... | 214 |
| Figure 15: Illustration de la CMI de l'extrait aqueux de <i>Teucrium polium</i> vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> | 214 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------|--|
| ABTS. | Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) |
| AFNOR. | Association française de normalisation |
| BHA. | Butyl hydroxy anisol |
| BHT. | Butyl hydroxy toluène |
| C.V. | Coefficient de variation |
| CCl ₄ . | Tétrachlorure de carbone |
| CCM. | Chromatographie sur couche mince |
| CER. | Glucocerebrosides |
| CER. | Glucocérébroside |
| CG/MS. | Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse |
| cm ² . | Centimètre carré |
| cm ³ . | Centimètre cube |
| CMB. | Concentration minimale bactéricide |
| CMI. | Concentration minimale inhibitrice |
| CPG. | Chromatographie en phase gazeuse |
| DL ₅₀ . | Dose Létale médiane |
| DO. | Densité optique |
| DPPH | Diphenylpicrylhydrazyl |
| EAG. | Equivalent acide gallique |
| EAU | Extraction assistée par ultrasons |
| EQ. | Equivalent de quercitine |
| FID. | Détecteur à ionisation de flamme |
| GP. | Gallate de propyle |
| HE. | Huile essentielle |
| HR. | Humidité relative |
| KHz. | Kilohertz |
| M. | Masse |
| MH. | Muller Hinton |
| min. | Minute |

| | |
|------------------|---|
| mL. | Millilitre |
| mm. | Millimètre |
| MPa. | Mégapascal |
| MS. | Matière sèche |
| MSR. | Méthodologie des surfaces de réponse |
| N. | Normale |
| ND. | Non détecté |
| NI. | Non identifié |
| nm. | Nanomètre |
| pH. | Potentiel hydrogène |
| PPM. | Partie par million |
| PRESS. | Predicted residual sum of squares |
| RDT. | Rendement |
| ROS. | Reactive oxygen species |
| SAB. | Sabouraud |
| SM. | Spectroscopie de masse |
| TBARS. | Substances réactives à l'acide thiobarbiturique |
| TBHQ. | Tertiobutylhydroquinone |
| TL ₅₀ | Temps létal médian |
| Tot. | Total |
| TR. | Temps de rétention |
| Tr. | Trace |
| US. | Ultrasons |
| UV. | Ultraviolet |
| W. | Watt |
| µg. | Microgramme |
| µl. | Microlitre |

Introduction

Introduction

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. Les principales espèces recensées sont le thym, la menthe, la lavande, la germandrée et le romarin. L'intérêt porté à ces plantes aromatiques et médicinales n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années.

Les huiles essentielles et les extraits de ces plantes ont trouvé leur place dans la conservation des aliments et la protection des denrées stockées. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Meriga** et al., 2012 ; **Pandini** et al., 2015 ; **Aghraz** et al., 2017 ; **Ben Othman** et al., 2017 ; **Sriti Eljazi** et al., 2018). Les huiles essentielles et les extraits de plantes semblent être une alternative aux produits chimiques de synthèses qui posent des problèmes de résistance et de toxicité par leurs résidus.

En effet, au cours de la transformation des aliments, la peroxydation des lipides entraîne non seulement une perte de qualité nutritionnelle et gustative des aliments, mais génère également des produits secondaires tels que les radicaux libres qui conduisent à diverses réactions chimiques indésirables (**Roby** et al., 2013 ; **Chaouche** et al., 2014).

Les antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroxyanisole butylé (BHA), le tertibutylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyle (GP) sont soupçonnés d'être toxiques et cancérigènes.

Pour remédier à ces inconvénients, il y a un intérêt croissant dans les études d'additifs naturels comme antioxydants potentiels. Les propriétés antioxydantes de nombreuses plantes aromatiques et médicinales se sont avérées efficaces pour retarder le processus de peroxydation des lipides dans les huiles et les aliments gras et ont suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche (**Kulisic** et al., 2004 ; **Khettaf** et al., 2016).

La capacité antioxydante de nombreuses plantes peut être attribuée à la présence des composés phénoliques (**Do** et al., 2014). Les polyphénols sont des substances naturelles capables de neutraliser les radicaux libres et de réduire les dommages dus au stress oxydatif sur le corps humain (**Hussain** et al., 2016). Par conséquent, il existe un intérêt croissant pour l'extraction de ces antioxydants végétaux et leur utilisation en tant qu'antioxydants naturels (**Padalia** et al., 2017). L'un des facteurs les plus importants affectant l'efficacité d'extraction des composés bioactifs à partir des plantes est le solvant d'extraction (**Ngo** et al., 2017).

La contamination des aliments par les micro-organismes reste une préoccupation pour les consommateurs et les industries agroalimentaires malgré l'utilisation de diverses méthodes de conservation. En raison de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques, il est de plus en plus intéressant d'utiliser des produits antibactériens et antifongiques naturels, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes, pour la conservation des aliments. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'efficacité de ces substances naturelles bioactives comme agents de conservation (**Al-Fatimi** et *al.*, 2007 ; **Abu-Darwish** et *al.*, 2012 ; **Yildirim** et *al.*, 2017 ; **Pušková** et *al.*, 2017).

Les pesticides chimiques utilisés en agriculture représentent une menace sérieuse et un véritable risque environnemental qui affecte essentiellement les qualités de l'eau souterraine et de l'atmosphère (**Salem** et *al.*, 2018). En effet, plusieurs études ont démontré l'écotoxicité des insecticides de synthèse (**Richter**, 2002). D'un autre côté, les pesticides ont des effets nocifs sur la santé humaine où 15 à 20% de ces produits chimiques sont des cancérigènes et des perturbateurs endocriniens (**Meyer**, 2003). De plus, les pesticides ont des effets chroniques importants sur la santé, notamment les maladies respiratoires et fœtales, le diabète, les troubles génétiques et neurologiques (**Tago** et *al.*, 2014). Étant donné l'impact important et le lien potentiel avec l'exposition aux pesticides, il est essentiel de restreindre considérablement l'utilisation de ces produits synthétiques nocifs et les remplacer par des produits naturels, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes. Ces derniers ont été utilisés avec succès dans la protection des denrées stockées contre certains ravageurs (**Kim** et *al.*, 2003 ; **Zekri** et *al.*, 2015 ; **Khan** et *al.*, 2017 ; **Yeom** et *al.*, 2018).

Actuellement, le principal souci des producteurs d'huiles essentielles est d'optimiser le rendement d'extraction tout en conservant leur qualité (**Zantar** et *al.*, 2015). De nombreuses techniques sont utilisées pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques, telles que l'hydrodistillation, l'extraction par fluide supercritique, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons (**Hesham** et *al.*, 2016). Dans le but d'augmenter les rendements d'extraction, de réduire la consommation d'énergie et de protéger l'environnement, l'extraction assistée par ultrasons s'est développée pour améliorer l'efficacité et réduire le temps d'extraction par rapport à l'hydrodistillation traditionnelle (**Li** et *al.*, 2014). L'ultrason est une technologie clé dans la réalisation de l'objectif de la chimie verte durable (**Chemat** et *al.*, 2017).

L'application de la méthodologie des surfaces de réponse (MSR) pour l'optimisation du rendement d'extraction des huiles essentielles de plantes a été étudiée par plusieurs auteurs (**Ranitha** et *al.*, 2014 ; **Kusuma** et **Mahfud**, 2016 ; **Zermane** et *al.*, 2016).

Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles est assez complexe, les composés terpéniques et aromatiques représentant les principaux constituants. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature de la fonction chimique du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques.

Dans le but d'étudier la possibilité de substituer les conservateurs chimiques et les insecticides de synthèses par des produits bioactifs naturels, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la composition chimique ainsi qu'à l'évaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae. Cette étude est également conçu afin d'optimiser l'effet du temps d'extraction, de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau sur le rendement d'extraction des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* par hydrodistillation assistée par ultrasons, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses. Nous nous sommes par ailleurs intéressés à l'étude de l'effet des différents solvants d'extraction (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, chloroforme, hexane et eau) sur les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des parties aériennes des plantes étudiées. La CPG et la CG/SM sont utilisées pour identifier les composés chimiques que renferment les huiles essentielles testées.

La présente étude est constituée de deux parties. La première partie est consacrée à une étude bibliographique portant sur les huiles essentielles et les composés phénoliques, la monographie des espèces étudiées, les activités antioxydante et antimicrobienne ainsi que la présentation du modèle d'insecte étudié. La seconde partie est dédiée à une étude expérimentale qui est principalement axée sur :

1. L'optimisation de l'extraction des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* par hydrodistillation assistée par ultrasons en utilisant la Méthodologie des Surfaces de Réponse (MSR) ;
2. L'élaboration des extraits non volatils à partir des plantes étudiées en utilisant différents solvants d'extraction ;
3. L'analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles examinées par CPG et CG/SM ;

4. L'évaluation de l'activité antioxydante des différentes essences et extraits non volatils des plantes étudiées et de certains antioxydants de synthèse (BHT et Trolox) ;
5. La détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits non volatils testés ;
6. L'évaluation du potentiel insecticide des huiles essentielles et des extraits non volatils examinés.

1^{ère} Partie

Etude

bibliographique

Chapitre I

Huiles essentielles
et composés phénoliques

Chapitre I

Huiles essentielles et composés phénoliques

1.1. Huiles essentielles

1.1.1. Définition

Le terme d'huile essentielle remonte au XVI^e siècle et dérive du médicament *Quinta essentia*, nommé par le médecin Suisse Paracelsus von Hohenheim (**Guenther**, 1948). Les huiles essentielles ou "essences" doivent leur nom à leur inflammabilité (**Dhifi et al.**, 2016). De nombreux auteurs ont tenté de fournir une définition des huiles essentielles. L'Association Française de Normalisation (**AFNOR**) donne la définition suivante (NF T 75-006): "L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par distillation à la vapeur soit par des procédés mécaniques de l'épicarpe des agrumes (Citrus), ou distillation "sèche". L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques" (**AFNOR**, 2000). Cette définition englobe toujours les produits obtenus à partir de matière première végétale, mais en utilisant d'autres méthodes d'extraction, telles que l'utilisation de solvants non aqueux ou l'absorption à froid. Ainsi, nous pouvons définir quatre types de produits (**Carette-Delacour**, 2000). Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur. Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques pour lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (**Pourmortazavi et Hajimirsadeghi**, 2007). Elles peuvent être synthétisées par tout organe végétal et stockées dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (**Burt**, 2004 ; **Bakkali et al.**, 2008). Elles se localisent dans toutes les parties des plantes aromatiques :

- 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 (comme dans la menthe), 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%. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Labiatae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les Asteraceae (camomille, absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les Lauraceae (cannelle, laurier). Beaucoup de végétaux contiennent des huiles essentielles ou des substances voisines mais en pratique peu d'espèces sont utilisées (**Hurtel**, 2006).

1.1.2. Le marché mondial des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles peuvent, soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies), soit être utilisées en l'état. Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %) (**Usaid**, 2008).

1.1.3. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques usuels et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau. Ces huiles volatiles sont généralement liquides et très rarement colorées à température ambiante. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, saffras et vétiver). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (on parle d'eau aromatique) (**Bruneton**, 2008 ; **Baser et Buchbauer**, 2010). Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de

constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés de phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part (**Bruneton**, 1993).

1.1.4. Composition chimique

Sur le plan chimique, les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène) (**Croteau et al.**, 2000).

1.1.4.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Les tetraterpènes sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ont pour formule générale : $(C_5H_8)_n$ ou n peut être de 9 à 30. Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (**Bakkali et al.**, 2008).

- Les monoterpènes sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HE, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène, *o*-cymène), monocyclique (terpinène, *p*-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique :
 - Alcools : géraniol, menthol.
 - Aldéhydes : géraniol, citronellal, sésényl. - Cétones : carvone, menthone, β -vétinone.
 - Esters : acétate de géranyle, acétate de linalyl, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle
 - Peroxydes : ascaridol, allicine (**Bruneton**, 2008).
- Les sesquiterpènes : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (**Bruneton**, 1999).

1.1.4.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. La biosynthèse par voie phenylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins réponde dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae : anis, fenouil, persil, cannelles (eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) (**Bruneton**, 1999).

1.1.4.3. Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés). Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînaibles par la vapeur d'eau (**Bruneton**, 1999).

1.1.4.4. Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle. Cette variation chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* et l'eucalyptus (**Zhiri** et **Baudoux**, 2005).

1.1.5. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

1.1.5.1. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. Ce procédé est de loin le plus réponde car il convient à la majorité des plantes. Il consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme

les HE sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles (**Fasty**, 2007). La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation (**Franchomme et Pénéol**, 1990).

1.1.5.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentín de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (**Dastmalchi et al.**, 2008).

1.1.5.3. L'expression à froid

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (**Chaintreau et al.**, 2003).

1.1.5.4. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73.8 bars et T = 31.1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique, est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (**Pellerin**, 2001). En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (**Richard**, 1992). Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (**Guan et al.**, 2007).

1.1.5.5. Hydrodistillation par micro-ondes sous vide

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction ou SFME) a été conçue pour des applications en laboratoire pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques (**Chemat et al.**, 2004a). Cette technologie est une combinaison de chauffage micro-ondes et d'une distillation à la pression atmosphérique. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes, sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par le végétal. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, le procédé SFME semble être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydrodistillation ou l'entraînement à la vapeur (**Lucchesi et al.**, 2004a ; **Lucchesi et al.**, 2004b). La

composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (**Bendahou et al.**, 2007 ; **Lucchesi et al.**, 2007). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Lucchesi et al.**, 2004a).

1.1.5.6. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est un nouveau procédé d'extraction permettant d'extraire des molécules de faibles poids moléculaires (**Hromadkova et al.**, 2002). Dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique, les ultrasons permettent l'extraction de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les huiles essentielles, les polysaccharides et les esters. Cette technologie s'est développée jusqu'au niveau industriel. En effet, les traitements par ultrasons améliorent l'extraction des composés phénoliques des végétaux (**Entezari et al.**, 2004 ; **Gonzalez et al.**, 2006 ; **Cabredo et al.**, 2006 ; **Corrales et al.**, 2008 ; **Chemat et al.**, 2011).

1.1.5.6.1. Principe

Les ultrasons sont des ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Elles ont la capacité de se déformer. Elles sont principalement caractérisées par leur fréquence (15 kHz-500 MHz). L'amplitude ou l'intensité des ondes permet de classer les ultrasons pour leurs applications industrielles : ultrasons de faible intensité (1-3 W/cm²), appliqués souvent pour le contrôle de la qualité des produits. Ces ultrasons génèrent de stable cavitation, alors que les ultrasons de forte intensité (10-1000 W/cm²) génèrent des cavitations transitoires, appliqués pour la modification des produits par rupture physique des tissus (**Santos et al.**, 2009). La propagation des ondes sonores dans les liquides soumis aux ultrasons à hautes intensités induit en alternance des cycles de haute pression (compression) et des cycles de basse pression (à basse pression). Les séries de ces cycles de compressions et de raréfactions créent une pression acoustique. Au cours du cycle de basse pression, les ondes ultrasonores créent des petites bulles de cavitation dans le liquide. Lorsque ces bulles atteignent un volume pour lequel elles ne peuvent plus absorber de

l'énergie, elles éclatent violemment au cours d'un cycle de haute pression (**Suslick**, 1998). L'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le principal effet physique et mécanique des ultrasons est alors la production de micro-jets dirigés vers une surface solide lors de l'implosion des bulles de cavitation (**Chemat et al.**, 2010). Les bulles entrent elles-mêmes en collision et sont responsables du phénomène de cavitation. Durant l'implosion, de très hautes températures (5000°C) et pressions (2000 atm) sont atteintes localement (**Santos et al.**, 2009) (Figure 1). Il est à noter que le niveau de température et de pression atteint dépend toutefois de la fréquence des ultrasons appliqués. L'implosion des bulles de cavitations provoquent également des jets de liquide qui peuvent atteindre la vitesse de 280 m/s.

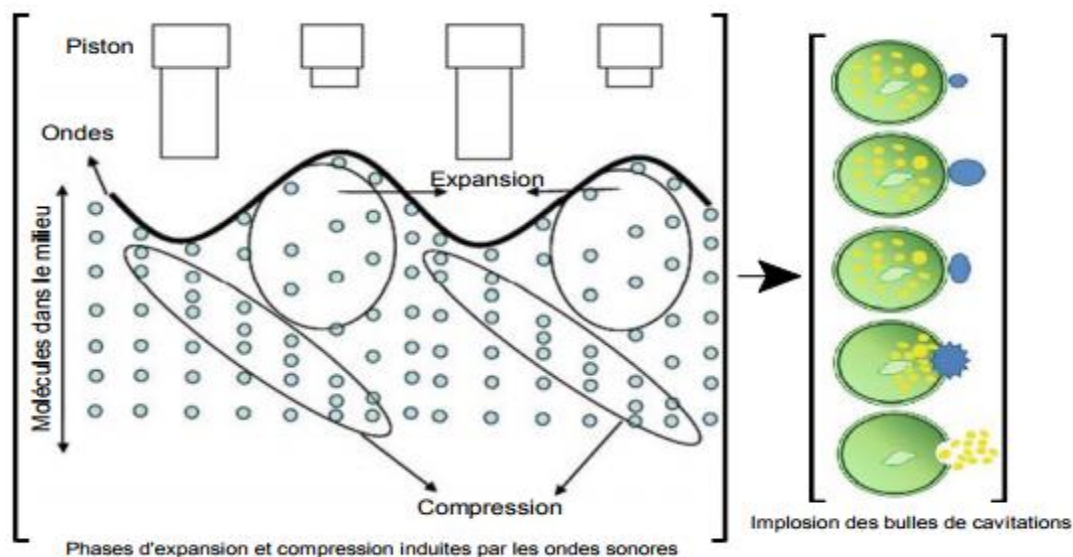


Figure 1 : Phénomènes de cavitation acoustique (**Santos et al.**, 2009).

Les effets sonochimiques de ces cavitations se traduisent entre autres par des accélérations de cinétique et/ou d'amélioration du rendement d'extraction solide-liquide (**Haunold**, 1991). Les membranes cellulaires des produits se trouvant à proximité subissent alors d'importants cisaillements répétitifs. Les forces de cisaillement résultant détruisent l'enveloppe des cellules, ce qui altère ces membranes cellulaires et libèrent le contenu intracellulaire dans le milieu environnant (**Chemat et al.**, 2004b).

1.1.5.6.2. Effet des paramètres opératoires

Une meilleure utilisation de la méthode d'extraction par ultrasons passe par l'optimisation de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres, on retrouve les paramètres

classiques tels que la nature du solvant, le rapport masse de matière/volume de solvant, le temps ou encore la taille des particules, mais également des paramètres plus spécifiques à la technique tels que la fréquence des impulsions, la température du bain, l'amplitude des impulsions, le mode continu ou alterne et la puissance (**Wang et Weller**, 2006). La sélection d'un solvant est généralement basée sur l'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté. Des études ont pu démontrer que pour obtenir une intensité de cavitation maximale, l'extraction à l'eau doit être effectuée à 35°C (bain-marie) alors que celle à l'éthanol doit être maintenue à 21°C (bain glycolé). Plusieurs études ont comparé l'efficacité de la technique d'extraction assisté par ultrasons aux techniques classiques telles que le Soxhlet (**Chemat et al.**, 2004b). Une étude a démontré que la température optimale d'extraction par ultrasons se situe entre 40 et 60°C (**Romdhane et Gourdon**, 2002). Ainsi comparé aux fortes températures nécessaires pour l'extraction au Soxhlet, cette technique permet d'éviter la dégradation de certains composés thermolabiles. De plus, le temps requis avec cette méthode est largement inférieur au temps nécessaire pour obtenir un résultat identique par macération au solvant ou par extraction Soxhlet. Cependant, les effets des ultrasons sur l'extraction en termes de rendement et de cinétique sont liés à la nature de la matrice elle-même. La présence d'une phase dispersée conduit à l'atténuation de vague d'ultrasons dans la proximité de l'émetteur ultrasonique. De plus, à haute puissance, il y a le risque de provoquer une altération de la qualité du produit.

1.1.5.7. L'enfleurage

La procédure met à profit la liposolubilité des composés odorants des végétaux dans les corps gras et qui permet l'exploitation des organes fragiles. Le matériel végétal est mis en contact avec des graisses, ces dernières ayant une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (**Lardry et Haberkorn**, 2007).

1.1.5.7.1. L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction, n'est plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer

davantage la senteur. L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (Möller, 2008).

1.1.5.7.2. L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (Möller, 2008).

1.1.6. Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svobda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2003).

1.1.7. Méthodes d'identification des huiles essentielles

1.1.7.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (Arpino et al., 1995). La

CPG est aussi une méthode d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (DSM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60%. En effet, le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantification réelle avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique (**Bicchi** et *al.*, 2008). Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température programmée (indice de rétention) (**Lawrencet**, 2000).

1.1.7.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux de composés de référence, contenu dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales (**Adams**, 2001). Dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (**Lianga** et *al.*, 2004 ; **Senatore** et *al.*, 2004). Il existe d'autres méthodes d'analyse, qui ont pour objet l'identification qualitative et quantitative, des différents constituants d'une huile essentielle on cite : l'HPLC, l'RMN, l'IR.

1.1.8. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées pour :

- Leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums ;
- Des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche ;
- Dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires ;
- Des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques; et aussi des propriétés antioxydantes;
- Un effet anesthésiant pour soigner les douleurs rhumatismales;
- Action stimulante sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication ;
- Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif, relaxant et déstressant ;
- Effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales (**Daniel**, 2006 ; **Hüsni** et **Buchbauer**, 2010) ;
- Plusieurs études ont montrés que l'utilisation des huiles essentielles peut diminuer les troubles menstruels, le stress post-partum ainsi que les troubles ménopausiques (**Lardry**, 2007).

1.1.9. Propriétés biologiques des huiles essentielles

1.1.9.1. Propriétés antioxydantes

Le pouvoir antioxydant des HE est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard**, 1992). Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes de propriétés selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne auto-catalytique de l'oxydation (**Multon**, 2002). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (**Madhavi** et *al.*, 1996). Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet** et **Lacroix**, 2007).

1.1.9.2. Propriétés antibactériennes et antifongiques

Les HE les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent aux Labiatae : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autre préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (**Pauli**, 2001). Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (**Kalembe et Kunicka**, 2003). Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (**Voukou et al.**, 1988). Il a été démontré que l'activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique : Phénols> Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures. Parmi les aldéhydes, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif (**Yen et Chang**, 2008).

1.1.9.3. Propriétés insecticides

L'effet insecticide des HE par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide (**Isman**, 1994). L'objectif est d'améliorer les techniques traditionnelles basées sur l'utilisation des ressources végétales renouvelables pour une meilleure gestion des déprédateurs dans les stocks de plus grande importance. Ces HE agissent par diffusion. C'est ce qui leur permet d'atteindre toutes les interstices dans la masse de graines stockées. Elles peuvent donc être utilisées en fumigation et leur emploi est facile.

1.1.10. Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalembe et Kunicka**, 2003 ; **Burt**, 2004). Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire

(**Carson et Riley**, 1995). Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Carson et Riley**, 1995 ; **Cox et al.**, 2000). D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Daferera et al.**, 2003).

1.1.11. Critère de qualité

Selon les **recommandations françaises** (2008), pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, présentées des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon satisfaisante. Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HE sont définies sur le plan français par des normes établies par l'AFNOR, élaborées par une commission spécifique. Ces normes sont établies en étroite collaboration avec les producteurs ainsi que les importateurs et sont le fruit d'un échange entre experts.

a. Dénomination botanique

L'origine végétale du produit doit être définie avec précision par la dénomination scientifique botanique selon les règles.

b. Conditions de production de la plante

Les matières premières végétales sont obtenues à partir de plantes de collecte ou de plantes cultivées, ces dernières pouvant être issues de semis ou de bouturage.

c. Partie de la plante utilisée

Les HE peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux les fleurs, les feuilles, bien que cela soit moins habituel, dans les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits secs, ou les graines.

d. Précision du chimiotype (ou chémotype)

Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimiotypes qui trouvent leur origine dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents.

e. Mode d'obtention de l'huile essentielle

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite.

f. Identification et analyses chromatographiques

L'analyse des HE, l'identification des constituants, la recherche d'éventuelles falsifications peuvent se faire à l'aide de techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse sur phases stationnaires polaires, apolaires, couplée avec une détection par spectrométrie de masse.

1.1.12. Toxicité des huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles n'est pas à prendre à la légère. Les effets toxiques sont très variables d'une huile essentielle à l'autre et dépendent beaucoup de la sensibilité des consommateurs. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de molécules, dont on peut distinguer deux groupes : les terpènes et les aromatiques. Les terpènes et leurs dérivés sont formés d'unités isopréniques (unités pentacarbonnées ramifiées). Pour cette gamme de composés, seules les molécules de poids faible, entre 10 et 20 atomes de carbones, sont présents dans les huiles essentielles. Par conséquent, elles peuvent plus facilement pénétrer notre peau et ainsi provoquer des allergies et des inflammations. Cependant, ces effets sont provoqués majoritairement par d'autres composés comme les lactones sesquiterpéniques, l'aldéhyde cinnamique et les phénylpropanoïdes. Les huiles essentielles contenant certains composés aromatiques, notamment les phénols et dérivés, comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol, sont à utiliser avec précautions. Ces molécules peuvent provoquer de sévères irritations sur les peaux sensibles ou les muqueuses. De plus, les cellules du foie peuvent se

trouver altérées, lorsque les doses prises sont élevées et que la durée de la cure est longue. D'autres familles de composés s'avèrent être également toxiques. Ceux sont les cétones, les aldéhydes et quelques esters. Les conséquences sur notre santé vont de la photosensibilisation et aux risques d'avortement, dans les cas les plus graves (**Cazzola et Doublet**, 2015).

1.1.13. Méthodologie des surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponses (MSR) consiste en un ensemble de techniques mathématiques et statistique qui a pour but d'explorer les relations entre les variables dépendantes et indépendantes impliquées dans une expérience. Elle est due aux travaux de **Box et Wilson** (1951). L'idée principale de leur méthode est l'utilisation d'une séquence d'expériences. **Box et Wilson** (1951) suggèrent d'utiliser un modèle à polynôme de second degré, mais concèdent que ce modèle n'est qu'une approximation. Toutefois, ce dernier a l'avantage d'être facile à estimer et à appliquer, même lorsque l'information disponible sur les processus en cours est minime. En statistiques, un plan factoriel est une expérience qui consiste à choisir des valeurs pour chacun des facteurs en faisant varier simultanément tous les facteurs, de façon exhaustive ou non. Le nombre d'essais peut alors devenir très grand. Une telle expérience permet l'étude de l'effet de chaque variable sur le processus, ainsi que l'étude de la dépendance (interaction) entre les variables.

1.1.13.1. Utilisation de la méthodologie des surfaces de réponse pour l'optimisation de l'extraction des huiles essentielles

Rezzoug, (2009) a utilisé la MSR pour optimiser le procédé d'extraction de l'huile essentielle à partir des graines de pin maritime. Cette méthodologie a fait l'objet d'une étude pour optimiser les conditions d'extraction de l'huile essentielle de *Herba Moslae* par CO₂ supercritique (**Nie et al.**, 2010). **Galadima et al.**, (2012), ont étudié l'optimisation des effets du rapport soluté/solvant, du temps et du taux de vapeur sur l'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* par distillation à la vapeur en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse. **Khosravi et al.**, (2013) ont utilisé la MSR pour l'optimisation du rendement d'extraction et des propriétés antioxydante de l'huile essentielle de fenouil par deux méthodes (Hydrodistillation et extraction assistée par ultrasons). **Eikani et al.**, (2014) ont étudié l'optimisation de l'extraction à l'eau surchauffée de l'huile essentielle extraite à partir d'écorce de cannelle en utilisant la MSR. Par ailleurs, la MSR a également été utilisée pour l'optimisation de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes de la citronnelle (*Cymbopogon*

citratu) (**Ranitha et al.**, 2014). Dans le même contexte, **Kamali et al.**, (2015) ont étudié l'optimisation des effets de la température, de la pression, du temps statique et du temps dynamique sur le rendement de l'huile essentielle de *Lavandula hybrida* extraite par CO₂ supercritique. De même, **Zermane et al.**, (2016) ont optimisé l'effet des paramètres opératoires (température et pression) sur le rendement d'extraction par CO₂ supercritique de l'huile essentielle de romarin.

1.2. Composés phénoliques

1.2.1. Définition

Les composés phénoliques, dénommés aussi polyphénols, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils représentent un vaste ensemble de plus de 10000 composés différents qui contiennent un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (**Hennebelle et al.**, 2004 ; **Li et al.**, 2014). Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils sont ainsi impliqués dans la physiologie, dans les mécanismes de défenses, ou encore dans la coloration des fleurs (**Macheix et al.**, 2005).

1.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques

D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignanes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (**Bruneton**, 2008). Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière (**Guignard**, 2000 ; **Bruneton**, 2008).

1.2.3. Classification des composés phénoliques

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories: les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (**Clifford**, 1999 ; **D'Archivio et al.**, 2007). La plupart des composés phénoliques naturels sont présents sous forme de conjugués avec des mono- et polysaccharides, liés à un ou plusieurs des groupes phénoliques, et peuvent également être présents sous forme de dérivés

fonctionnels tels que les esters et les esters méthyliques (**Shahidi** et **Naczk**, 1995 ; **Harborne** et *al.*, 1999 ; **Balasundram** et *al.*, 2006). Bien qu'une telle diversité structurale résulte de la large gamme de composés phénoliques présents dans la nature, les polyphénols peuvent être classés en plusieurs catégories (**Harborne** et *al.*, 1999) (Tableau 1). Parmi celles-ci, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques alimentaires (**King** et **Young**, 1999).

Tableau 1 : Classes des composés phénoliques dans les plantes (**Harborne** et *al.*, 1999).

| Classe | Structure |
|--|--|
| Polyphénols simples, benzoquinones | C ₆ |
| Acides hydroxybenzoïques | C ₆ -C ₁ |
| Acéthophénones, acides phénylaétiques | C ₆ -C ₂ |
| Acides hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarine, isocoumarines, chromones, chromenes) | C ₆ -C ₃ |
| Naphtoquinones | C ₆ -C ₄ |
| Xantones | C ₆ -C ₁ -C ₆ |
| Stilbènes, anthraquinones | C ₆ -C ₂ -C ₆ |
| Flavonoïdes, isoflavonoïdes | C ₆ -C ₃ -C ₆ |
| Ligane, neoligane | (C ₆ -C ₃) ₂ |
| Biflavonoïdes | (C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂ |
| Lignines | (C ₆ -C ₃) _n |
| Tanins condensés (proanthocyanidines ou flavolanes) | (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n |

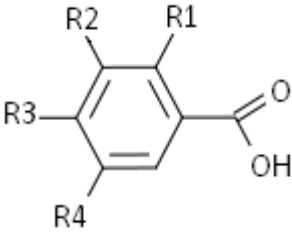
1.2.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent une classe très importante de polyphénols et représentent un tiers des composés phénoliques consommés (**Yang** et *al.*, 2001). Dans les aliments, ces composés sont présents sous forme d'esters, solubles et accumulés dans les vacuoles ou insolubles comme composants de la paroi cellulaire (**Yang** et *al.*, 2001). Ces acides phénoliques peuvent seulement être libérés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline),

ou enzymatique (Tsao, 2010). Les acides phénoliques se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques avec leurs dérivés respectifs (Yang et al., 2001).

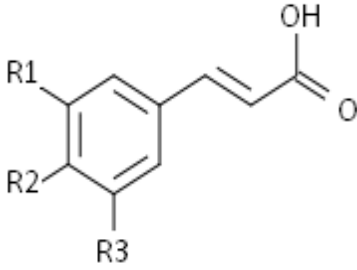
Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (Tableau 2). Ils existent fréquemment sous formes d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins (Brglez Mojzer et al., 2016).

Tableau 2 : Structure des acides hydroxybenzoïques (Macheix et al., 2006).

| Structure générale | R1 | R2 | R3 | R4 | Acides phénoliques |
|--|----|------------------|----|------------------|----------------------------------|
|  | H | H | H | H | Acide benzoïque (non phénolique) |
| | H | H | OH | H | Acide p-hydroxybenzoïque |
| | H | OH | OH | H | Acide protocatéchique |
| | H | OCH ₃ | OH | H | Acide vanillique |
| | H | OH | OH | OH | Acide gallique |
| | H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Acide syringique |
| | OH | H | H | H | Acide salicylique |
| | OH | H | H | OH | Acide gentisique |

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique (Tableau 3). L'acide caféique est l'acide phénolique le plus abondant dans de nombreux fruits et dans le café, le plus souvent estérifié avec de l'acide quinique (acide chlorogénique). Un autre acide phénolique commun est l'acide férulique, présent dans les céréales et estérifié en hémicelluloses dans la paroi cellulaire (D'Archivio et al., 2007).

Tableau 3 : Structure des acides hydroxycinnamique (Macheix et al., 2006).

| Structure générale | R1 | R2 | R3 | Acides phénoliques |
|---|------------------|------------------|----|-----------------------------------|
|  | H | H | H | Acide cinnamique (non phénolique) |
| | H | OH | H | Acide p-coumarique |
| | OH | OH | H | Acide caféique |
| | OCH ₃ | OH | OH | Acide férulique |
| | OCH ₃ | OCH ₃ | OH | Acide sinapique |

1.2.3.2. Les flavonoïdes

1.2.3.2.1. Structure et classification des flavonoïdes

Jusqu'à présent, plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés (Wang *et al.*, 2011). Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C₆ (A et B), reliés par un hétérocycle en C₃ (Bruneton, 1999 ; Pietta, 2000) (Figure 2).

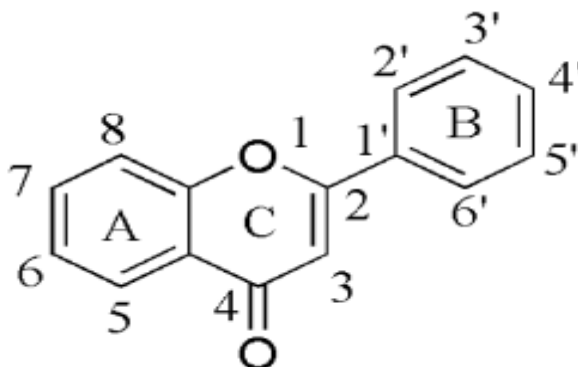


Figure 2 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (Isoda *et al.*, 2014).

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006). Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres. . .) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002).

1.2.3.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent le même squelette car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune (Marais *et al.*, 2007 ; Winkel, 2007) (Figure 3). Les composés de départ de la biosynthèse des flavonoïdes sont le malonyl CoA, le cinnamoyl CoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique (Gerhard, 1993). Ces composés sont formés suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate (Hollman *et al.*, 1999 ; Middleton, 2000). La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C₃ qui formera le cycle oxygéné C de la structure de base des flavonoïdes.

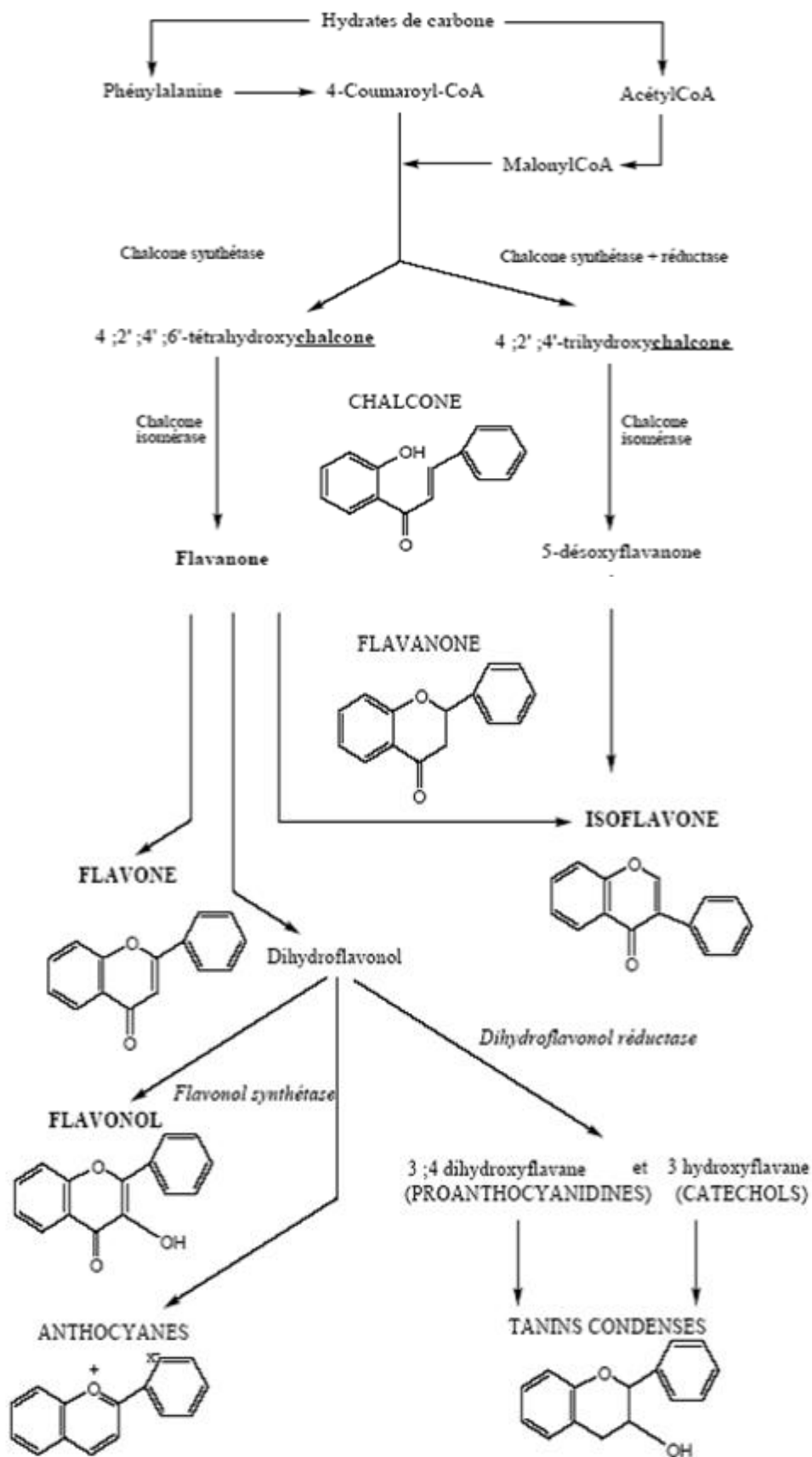


Figure 3 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Gerhard, 1993).

La voie acétate malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. Ce système aromatique est formé par condensation répétée d'unités d'acétate (**Gerhard**, 1993). Ces deux voies sont alors condensées pour engendrer un précurseur commun la 4, 2',4',6' tétrahydroxychalcone avec la catalyse de la chalcone synthase (**Middleton**, 2000). Ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes de flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques. Des réactions post-biosynthétiques sont enfin effectuées pour donner la structure finale aux flavonoïdes tels que la glycosylation et l'acylation (**Marfak**, 2003). Il existe cependant des flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine (**Bruneton**, 1993 ; **Remesy et al.**, 1996 ; **Middleton**, 2000).

1.2.3.3. Les tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (**Aguilera-Carbo et al.**, 2008). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert**, 1991). Selon leurs structures biochimiques, on distingue deux classes de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Les tannins hydrosolubles ou acides tanniques ont un noyau de sucre lié par estérification à l'acide gallique (gallotanins) ou à l'acide ellagique (ellagitanins). Les tanins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, possèdent comme structure de base le flavan-3-ol ou le flavan-3,4-diol (**Bruneton**, 1999). Ces tannins ne renferment pas de sucres dans leurs molécules.

1.2.4. Biodisponibilité des composés phénoliques

La plupart des polyphénols sont présents sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères qui peuvent souvent ne pas être absorbés tels quels. Ces composés vont être hydrolysés en aglycones par des enzymes intestinales ou par la microflore avant d'être absorbés. Dans les enterocytes et ensuite au niveau du foie, les polyphénols sont conjugués avec des acides glucoroniques et des sulfates. Les métabolites circulant au niveau du sang sont des dérivés conjugués fortement liés à l'albumine (**Manach et al.**, 2006). Ensuite les polyphénols peuvent pénétrer dans les tissus.

1.2.5. Activités biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain. Ainsi, **Halliwell** (1994) confirme que les polyphénols sont connus par leurs activités antioxydantes. En effet, en conditions physiologiques, le dioxygène

produit au niveau des mitochondries des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est toxique pour l'intégralité de la cellule. Dans ce cas l'activité antioxydante des polyphénols peut se faire par piégeage direct des ERO aussi bien en phase aqueuse qu'en phase organique. Ces polyphénols peuvent agir aussi par deux autres mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition des enzymes pro-oxydantes et la chélation des ions métalliques et un deuxième consiste à la protection des systèmes biologiques de défenses anti-oxydantes. L'étude de **Halliwell** (1994) a montré que l'activité anti-oxydante des polyphénols est déterminée par leurs structures, en particulier la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Par la suite, **Fuchs** (1998) a montré que les polyphénols sont connus dans la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par les rayons solaires, raisons pour lesquelles les polyphénols sont présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (**Mena et al.**, 2014).

Des études plus récentes ont montré que les polyphénols présentent une activité antibactérienne importante (**Ferrazzano et al.**, 2011). Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (**Wu et al.**, 2013) et un deuxième provoquant l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (**Tsuchiya et Linuma**, 2000).

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes comme les xanthonés, la quercétine, la gossypétine, la myricétine et l'epicatechin-3-gallate ont été révélés comme des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (**Brühlmann et al.**, 2004). Ces produits naturels agissent en inhibant l'AChE ce qui va corriger le déficit de l'acétylcholine et améliorer son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du niveau de l'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (**Heinrich et Theoh**, 2004).

Huang et Lin (2012) ont montré que les polyphénols sont aussi utilisés pour diminuer du taux de cholestérol dans le sang.

Les flavonoïdes ont été utilisés dans le traitement des affections hépatiques. Ainsi, un mélange constitué de composés de type flavolignane et flavanone appelé silymarine, testée sur un modèle expérimental animal, a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement (**Magliulo et al.**, 1973).

Une autre étude réalisée par **Martin et al.** (1994) montre que les flavonoïdes présentent un effet antiallergique. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des cellules impliquées dans les réponses immunitaires : les mastocytes et les basophiles.

Les polyphénols présentent d'autres activités anti-inflammatoire (**Sakurai et al.**, 2010) et antivirale et en particulier anti-HIV (**Liu et al.**, 2005).

Les flavonoïdes et en particulier la naringine, la quercétine et l'hypolaetine-8-glucose isolé des espèces du genre *Sideritis*, présente une activité antiulcéreuse importante, ils sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes (**Villar et al.**, 1987).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes présentent des effets protecteurs vasculaires. Ils agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique (**Berg et Daniel**, 1988). Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (**Shih et al.**, 2004 ; **Youdim et al.**, 2002).

Les flavonoïdes présentent une activité antidiabétique, ils agissent par inhibition de l'aldose réductase du cristallin (**Chaudhry et al.**, 1983), exemple lamyricétine qui présente des effets hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant chez les animaux diabétiques (**Ong et Khoo**, 1997).

Plus récemment, **Mena et al.** (2014) indiquent que les polyphénols isolés des extraits des végétaux peuvent être utilisés dans la chimiothérapie. D'autres études ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols et en particulier en flavonoïdes diminue le risque de cancer (**Block et al.**, 1992). Ainsi, ces flavonoïdes peuvent agir en affectant la promotion des tumeurs au début de la cancérogenèse par une augmentation des processus de désintoxication exemple les flavonoïdes d'agrumes qui sont connus comme des inhibiteurs d'ornithine décarboxylase promoteur du cancer de la peau (**Manach et al.**, 1996).

Chapitre II

*Monographie des espèces
étudiées*

CHAPITRE II

Monographie des espèces étudiées

2.1. Famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae (Labiatae) du Latin « Labia » qui signifie lèvre, en raison de la forme caractéristique des fleurs à deux lèvres (**Couplan**, 2000 ; **Naghbi** et *al.*, 2005), comprend environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais dont la plupart se concentre dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la menthe, la lavande, la germandrée et le romarin (**Botineau**, 2010). Cette famille est l'une des premières à être distinguées par les botanistes (**Pistrick**, 2002) et ceci par la particularité de ses caractères. Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules. Le plus souvent hermaphrodites, les fleurs pentamères (**Meyer** et *al.*, 2004) sont généralement réunies en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis fruit constitué par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne (**Messaili**, 1995). Cette famille est donc caractérisée par :

- une corolle gamopétale irrégulière à deux lèvres, la supérieure formée de deux pétales, l'inférieure de trois ;
- quatre étamines dont deux plus longues ;
- ovaire de deux carpelles recoupés par une cloison et comprenant ainsi quatre loges à une graine chacun (tétrachaine) ;
- des feuilles opposées et, souvent, une tige de section carrée.

La plupart des genres ont une importance économique due à leur richesse en huiles essentielles et leur utilisation en tant que condiments ainsi qu'infusions très prisées. Ainsi, ils ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques dans le but d'évaluer la présence de certains métabolites secondaires typiques (**Wink**, 2003). La famille des Lamiaceae est très importante

dans la flore algérienne, mais certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces (**Quezel et Santa**, 1963). Notre travail porte sur l'étude de deux espèces appartenant à la famille des Lamiaceae : *Mentha pulegium* et *Teucrium polium*.

2.2. *Mentha pulegium* L.

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, sont des herbacées vivaces, indigènes et très odorantes appartenant à la famille des Lamiaceae (**Jahandiez et Marie**, 1934). Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces de menthe doivent leur odeur et activité à leurs huiles essentielles ou essences de menthe (**Benayad**, 2008). Autant les menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires et des origines hybrides qui les relient. Parmi toutes les Lamiaceae, les menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales (**Benayad**, 2008). La menthe pouliot, *Mentha pulegium*, est l'espèce la plus exploitée pour ses vertus médicinales et aromatiques (**Rana et al.**, 1997 ; **Cantino**, 1998).

2.2.1. Aspects botaniques

Mentha pulegium, très répandue dans l'aire méditerranéenne, est connue sous le nom de « menthe pouliot ». Elle est fréquente dans les milieux humides et elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces (**Bekhechi**, 2008). Malgré son utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, son intérêt économique demeure limité.

C'est une plante de 10 à 30 cm de hauteur, à inflorescence formée de nombreux verticillés denses, feuillés et distants (**Quezel et Santa**, 1963). Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense. Les feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole (Figure 4). Les fleurs, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches échelonnées le long de la tige. Chaque inflorescence, en cyme, est axillée par une bractée foliacée. Elle englobe jusqu'à 30 fleurs. Deux préfeuilles, réduites, naissent à la base de chaque inflorescence. Le calice, persistant et finement velu, est en cloche. Il est faiblement bilabié, strié et à 5 dents subégales (les 2 dents inférieures sont plus étroites). La corolle est

gamopétale formée de cinq pétales soudées. Le fruit est constitué de 4 akènes (Quézel et Santa, 1963 ; Arvy et Gallouin, 2003).



Figure 4: *Mentha pulegium* L. (Sutour, 2010).

2.2.2. Position systématique

D'après Quézel et Santa (1963) et Guignard et Dupont (2004), la systématique de *Mentha pulegium* est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha pulegium* L.

2.2.3. Aires de répartition

C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte). En France, cette plante est très commune jusqu'à 1800 m d'altitude (Gamisans et Jeanmonod, 1993). En Algérie, *Mentha pulegium* est très abondante

et pousse spontanément (**Quézel et Santa**, 1963). Elle se rencontre dans les zones humides et généralement marécageuses, près des routes, et elle est plus abondante dans les pâturages de montagnes (**Chalchat et al.**, 2000).

2.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle

La menthe pouliot, connue sous le nom vernaculaire arabe de « Fliyou », est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures (**Agnihotri et al.**, 2005 ; **Diaz-Maroto et al.**, 2007). Les parties aériennes fleuries de cette plante sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (**Zargari**, 1990 ; **Delille**, 2007).

Depuis l'antiquité, Les Menthes conservent une grande diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Elles fortifient tout le système nerveux, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible, la menthe rend d'éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses (**Benayad**, 2008).

2.2.5. Composition chimique de *Mentha pulegium*

La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a fait l'objet de nombreuses études (Tableau 4). Elle est caractérisée par la présence majoritaire de cétones possédant un squelette menthanique. En effet, les compositions décrites sont dominées soit par la pulégone 80.3% au Maroc (**Bouchra et al.**, 2003), 65.9-83.1% en Inde (**Agnihotri et al.**, 2005), 73.4% en Uruguay (**Lorenzo et al.**, 2002) et 43.5% en Egypte (**El-Ghorab**, 2006); soit par la pipériténone 83.7-97.2% en Grèce (**Kokkini et al.**, 2002) ou encore la pipéritone 70.0% en Autriche (**Zwaving et Smith**, 1971).

Les autres compositions chimiques résultent de l'association de la pulégone avec : la piperiténone au Portugal 35.1/27.4% (**Mata et al.**, 2007), en Bulgarie 27.2-49.7/19.4-57.7% (**Stoyanova et al.**, 2005) et en Grèce 32.8-75.8/5.1-35.0% (**Cook et al.**, 2000), l'isomenthone en Suisse 20.0-34.6/18.9-42.1% (**Sticher et Flück**, 1968), en Grèce 32.8- 75.8/4.3-28.6% (**Kokkini et al.**, 2004) et en Turquie 32.1-43.8/41.7-52.0% (**Başer et al.**, 1999), la menthone en Iran 37.8-20.3% (**Aghel et al.**, 2004), en Turquie 26.6-57.3/ 25.1-59.1% (**Başer et al.**, 1999) et au Japon 50.5/26.4% (**Fujita et Fujita**, 1967).

Tableau 4: Composition chimique d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* de la littérature de différentes origines (Sutour, 2010).

| constituants | Maroc | Inde Hymalaya | Egypte | Uruguay | Autriche | Grèce |
|-----------------|-------|---------------|--------|---------|----------|-----------|
| menthone | 0,3 | 8,3-8,7 | - | 3,6 | 8,0 | - |
| isomenthone | - | 3,8-4,0 | - | 12,9 | - | - |
| cis-isopulégone | - | - | - | 1,4 | - | - |
| menthol | 0,7 | - | - | 0,1 | - | - |
| néomenthol | - | - | - | - | - | - |
| pulégone | 80,3 | 65,9-83,1 | 43,5 | 73,4 | - | - |
| pipéritone | 0,9 | 1,3-3,2 | 12,2 | 0,1 | 70,0 | - |
| pipériténone | - | - | - | 0,9 | - | 83,7-97,2 |

| Constituants | Grèce | Bulgarie | Grèce | Turquie | Japon |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------|
| menthone | 0,1-2,8 | 1,1-5,8 | 2,2-8,8 | 25,1-59,1 | 26,4 |
| isomenthone | 4,3-28,6 | 3,8-14,3 | 7,5-20,5 | - | - |
| cis-isopulégone | - | 3,8-14,3 | tr-0,1 | - | - |
| menthol | tr-1,4 | tr-1,8 | - | - | - |
| pulégone | 32,8-75,8 | 27,2-49,7 | 40,8-53,7 | 26,6-57,3 | 50,5 |
| pipéritone | 0,5-5,2 | 5,1-6,5 | 2,0-11,4 | - | - |
| pipériténone | 5,1-35,0 | 19,4-57,7 | 3,9-10,6 | - | - |

| Constituants | Turquie | Iran | Portugal | Suisse | Turquie | Iran |
|--------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| menthone | - | 20,3 | - | 1,4-4,4 | 36,4 | 3,0 |
| isomenthone | 41,7-52,0 | - | - | 18,9-42,1 | - | - |
| néomenthol | - | - | - | - | 19,0 | - |
| pulégone | 32,1-43,8 | 37,8 | 35,1 | 20,0-34,6 | 25,2 | 2,3 |
| pipéritone | - | - | - | tr-0,8 | - | 38,0 |
| pipériténone | - | 6,8 | 27,4 | - | - | 33,0 |

Il est à noter que des extraits, obtenus par macération à l'hexane à partir de plants récoltés en Tunisie, possèdent une composition très proche des huiles essentielles décrites ci-dessus. La pulégone (17.5-70.2%) et l'isomenthone (2.9-34.2%) sont les principaux constituants (Mkaddem et al., 2007).

2.3. *Teucrium polium* L.

Le nom générique des germandrées désigne en Latin "teucrion" en grec "τευκπion" troie, ou de teucros, prince troyen qui aurait découvert les propriétés médicinales de la plante (Couplan, 2000). Le genre *Teucrium* fait partir des genres les plus importants de la famille des Lamiaceae. Ce genre est réparti en 340 espèces et variétés environs. D'un point de vue taxonomique, elles sont identifiables grâce à la forme du calice et inflorescence (Velasco-Negueruela et Perez-Alonso, 1990 ; Grubešić et al., 2007). Il s'agit d'un grand genre qui diffère des autres que dans ses corolles formées d'une lèvre supérieure fendue et à étamines

redressées au-dessus de cette fente, de sorte que la corolle paraît n'avoir qu'une lèvre inférieure à cinq lobes (**Ozenda**, 1977). Un grand nombre de travaux ont été publiés récemment sur la taxonomie de ce genre basé sur des études morphologiques (itiorescences et calice) (**El Oualidi**, 1991), micromorphologiques (trichomes) (**Grubešić et al.**, 2007), mais les relations au sein du groupe restent confuses (**Harborne**, 1986).

2.3.1. Description botanique

Teucrium polium, connue sous le nom de « germandrée tomenteuse » en français ou « Kheyata » en arabe, est un sous arbrisseau à pousses nombreuses pouvant atteindre 45 cm de haut. Les rameaux peuvent être dressés ou ascendants avec un tomenteux blanc ou doré. Les feuilles dont la taille varie de 7 à 27 mm sont presque sans pétiole, opposés ou groupées en bouquet (Figure 5). Les fleurs sont en grappes denses au sommet des rameaux, les feuilles sont oblongues, entières et crénelées. La corolle peut être blanche, jaune à rose ou pourpre, le fruit quant à lui est indéhiscent (**Bartels**, 1998). Cette espèce est représentée par de nombreuses sous-espèces dont la détermination reste assez délicate (**Quézel et Santa**, 1963). En Algérie, pas moins de douze sous-espèces parmi lesquelles la sous espèce *polium* qui est la plus répandue, sont recensées (**Djabou**, 2012).

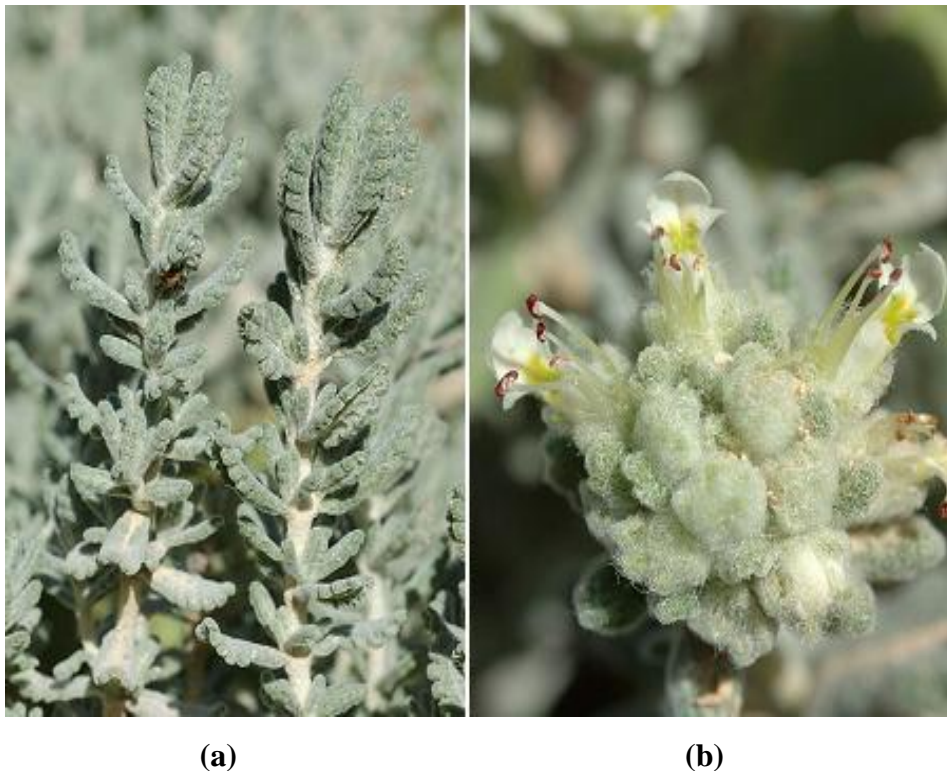


Figure 5 : Feuilles (a) et fleurs (b) de *Teucrium polium* L. (**Djabou**, 2012).

2.3.2. Position systématique

D'après **Quézel** et **Santa** (1963), la systématique de *Teucrium polium* est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Teucrium*

Espèce : *Teucrium polium* L.

2.3.2. Air de répartition

Il existe plus de 300 espèces de germandrée réparties à travers le monde. L'espèce s'étend de l'Asie occidentale en passant par l'Europe et le Maghreb et jusqu'au nord de l'Amérique. Elle est très ré pondue en méditerranée, mais on la trouve également en Iran et en Turquie à l'est, en Scandinavie au nord et même au Canada à l'ouest. En Algérie, *Teucrium polium* pousse spontanément et prédomine dans la région du Tell (**Quézel** et **Santa**, 1963). Elle est très polymorphe et croit dans les lieux rocailleux et secs (**Djabou**, 2012).

2.3.4. Utilisations en médecine traditionnelle

La germandrée est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. En effet, elle permet la relaxation des muscles en augmentant leur force, la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité. De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter la concentration et la lucidité. Elle possède également une action bénéfique sur la digestion. Ses propriétés antistress et antioxydante permettent de lutter contre le vieillissement de la peau. Pour cela, elle est conseillée pour les personnes stressées, ainsi que les personnes de plus de 50 ans et les sportifs (**Lagnika**, 2005). Ses feuilles sont utilisées en cuisine et à des fins médicinales, en particulier pour le traitement des troubles intestinaux et gastriques. Cette espèce a également fait preuve d'un soulagement dans le cas de la douleur viscérale. Bien qu'elle soit souvent utilisée pour traiter les troubles de glycémie chez les diabétiques, les études n'ont pas réussi à montrer un intérêt de l'utilisation de *Teucrium polium* pour les

diabétiques (**Ashnagar** et al., 2007). La plante est utilisée comme dépuratif et pour traiter les maladies du foie, de l'hypertension, le traitement des ulcères gastroduodénaux et de l'hyperlipidémie (**Parsaee** et **Shafiee-Nick**, 2006 ; **Stella** et al., 2010). Par ailleurs, les germandrées font partie, avec le Cymbopogon, des plantes les plus prisées au Tassili car c'est une plante parfumée très appréciée et recherchée des Touaregs (elles parfument agréablement le thé). Elle est également broutée par les herbivores (**Benchelah** et al., 2004).

Teucrium polium a été reconnue depuis longtemps en médecine populaire dans le traitement physiopathologique de nombreuses maladies. A cet effet, elle a été utilisée dans le traitement des inflammations et des rhumatismes (**Panovska** et al., 2007). Son extrait a montré des pouvoirs hypotenseurs (**Kamel** et **Sandra**, 1994), antispasmodique, antibactériens, antipyrétique, diaphorétique, tonifiant, des effets analgésiques (**Kawashty** et al., 1997) et des effets antioxydants (**Hasani** et al., 2007 ; **Bezić** et al., 2011). L'extrait aqueux de *Teucrium polium* a longtemps été utilisé en Iran pour le traitement du diabète et possède des effets hypolipidémiques (**Rasekh** et al., 2001 ; **Esmaeili** et **Yazdanparast**, 2004 ; **Ricci** et al., 2005 ; **Ardestani** et **Yazdanparast**, 2007 ; **Hasani** et al., 2007).

2.3.5. Composition chimique de *Teucrium polium*

L'espèce *Teucrium polium* a fait l'objet de plusieurs enquêtes durant ces dernières années (**Hasani** et al., 2007). Ces enquêtes ont révélé la présence de différentes classes de composés isolés des extraits de la germandrée tels que les esters d'acides gras, les diterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les polyphénols et les flavonoïdes (cirsimarine, cirsilol, cirsilinol, le 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone, salviginine, apigénine-5-galloylglucoside, apigénine-7-glucoside, vicénine et luteoline-7-glucoside) (**Velasco-Negueruela** et **Perez-Alonso**, 1990) (Tableau 5).

Concernant la composition chimique des huiles essentielles de *Teucrium polium* nous avons répertorié plusieurs travaux traitant de l'identification des constituants de son huile essentielle. Deux types d'huile essentielle sont ainsi distingués : (i) une est riche en composés monoterpéniques tels l' α et β - pinène, le limonène, le myrcène, et le linalol, le terpinène-4-ol et la carvone et (ii) l'autre est dominée par des composés sesquiterpéniques comme le (E)- β -caryophyllène, le germacrène D et l' α -humulène et l'oxyde de caryophyllène, l' α et le t-cadinol et le spathulénol.

Tableau 5 : Quelques exemples de composés isolés des extraits de *Teucrium polium*
(Hammoudi, 2015).

| Espèce | Principes actifs isolés | Références |
|---|--|--------------------------------|
| <i>Teucrium polium</i> (Spain) | Flavonoïdes: cirsiol, cirsimaritrine, cirsilincol, salviginine et 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone. | Harborn et al. , 1986 |
| <i>Teucrium polium</i> (Majorca) | Ajugapitin, 15-éthoxy-14-hydroajugapitin, 14-hydro-15-hydroxyajugapitin, 14,15-dihydroajugapitine, Chamaepitine, 19-acétylnaphaline, auropoilne, teucrine A, teufline, 20-acétyhuopoline, auropoline | Camps et al. , 1986 |
| <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>vincentinum</i> | Diterpenoides : eriocephaline, teuvincentines A, B et C, 7,8-dehydroeriocephaline, 7-acétylteuvincentine A, 7,8-dehydroeriocephaline, 6,7-diacétylteuvincentine B, 6-acétylteuvincentine B. | Carreiras et al. , 1988 |
| <i>Teucrium polium</i> L. | Teupolioside III | Oganesyan et al. , 1991 |
| <i>Teucrium polium</i> var. <i>album</i> ; (Qatar); <i>Teucrium polium</i> var. <i>pilosum</i> (Egypt) | Sesquiterpènes (alcools): 10-cadinol (8.98%), 13-eudesmol (19.1%), spathuléol (11.59%). Monoterpènes majoritaires : α et β -pinene (4.09% et 4.90%). | Kamel et Sandra , 1994 |
| <i>Teucrium polium</i> (Egypt) | Apigénine 7-glucoside, vicénine-2, luteoline 7-glucoside et apigénine 5-galloylglucoside | Kawashty et al. , 1997 |
| <i>Teucrium polium</i> (Turkey) | Teuloline A, teuloline B | Bedir et al. , 1999 |
| <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>polium</i> | Auropolin, capitatine, 20-epiauropoline, acétylauropoline lactone | Bruno et al. , 2003 |
| <i>Teucrium polium</i> | Tyrosol, lutéoline, acide o-hydroxy benzoïque, hydroxytyrosol acide p-hydroxybenzoïque, quercétine, acides : vanillique, gentisique, ferulique et cafféique. | Proestos et al. , 2006 |
| <i>Teucrium polium</i> L. (Iran) | Huile essentielle : α -pinène (12.52%) ; linalool (10.63%) ; caryphyllénoxyde (9.96%) ; caryophyllène (6.98%). | Moghtader , 2009 |
| <i>Teucrium polium</i> L. | Phényléthanoïde glycoside poliumoside B | Marino et al. , 2012 |
| <i>Teucrium polium</i> L. | Glycosides phénylpropanoïdes (verbascoside et poliumoside) et une flavone apigénine | Goulas et al. , 2012 |

Chapitre III
Activité
antioxydante

CHAPITRE III

Activité antioxydante

3.1. Stress oxydant

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (**Favier**, 2003). Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour Reactive Oxygen Species) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire, c'est notamment le cas au niveau des mitochondries d'une cellule (**Pincemail**, 2001). De nombreux ROS sont des radicaux libres, possédant des propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec leurs environnements chimiques, incluant une série de substrats biologiques d'importance (lipides, protéines, ADN, sucres,...). Au niveau moléculaire, ces ROS peuvent également jouer le rôle de messagers secondaires en activant différents facteurs ou indirectement des gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (**Desmier**, 2016). Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a en parallèle développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production de ces ROS. Ces mécanismes font intervenir un système endogène (enzymatique ou non enzymatique), mais également des molécules provenant de l'alimentation incluant des vitamines et des oligoéléments (**Favier**, 2006).

Il est important de noter que le stress oxydant peut être également la conséquence de l'effet de facteurs environnementaux. En effet, la vie moderne confronte notre organisme à des facteurs provoquant une surproduction de ROS tels que la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition au soleil ou encore le tabagisme (**Haleng**, 2007). Ceci conduit soit à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes soit à la synthèse directe de ROS, pouvant engendrer des dégâts cellulaires. Un stress oxydant peut se développer lors d'une chirurgie cardio-vasculaire, d'une transplantation d'organes ou d'une détresse

respiratoire mais aussi en cas d'exercice intense mal maîtrisé. En parallèle de ces agressions, la situation s'aggrave du fait d'une alimentation moins saine et moins équilibrée qu'auparavant (**Desmier**, 2016). Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet prioritaire en termes de prévention de maladies. En effet, de nombreuses études indiquent qu'il existe une association entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 physiopathologies différentes comme l'athérosclérose ou le cancer mais également le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement (**Hybertson et al.**, 2011).

3.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta**, 2003).

Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres (**Hubert**, 1998).

3.3. Les antioxydants

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc : (i) prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou (ii) désactiver directement les ROS (**Desmier**, 2016). Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction

en chaîne de formation des peroxydes (**Tian et White**, 1994). Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (**Poknory**, 2001). L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à cette action protectrice. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (**Tian et White**, 1994). Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction. Les antioxydants sont un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques ou non, de vitamines, d'oligo-éléments ou encore de polyphénols (**Desmier**, 2016). Les antioxydants peuvent être classés en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques).

3.3.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al.**, 2004).

- **La superoxyde dismutase (SOD)** : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD, SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) (**Piquet et Hebuterne**, 2007).

- **La catalase**: présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Piquet et Hebuterne**, 2007).

- **La glutathion peroxydase (GPx)** : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs

avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (**Piquet** et **Hebuterne**, 2007).

3.3.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Wang** et *al.*, 2003).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposées. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, la β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Koechlin-Ramonatxo**, 2006). Les sources alimentaires de ces antioxydants naturelles sont présentées dans le Tableau 6.

3.4. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier**, 2006).

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- **Système de défense primaire** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.

- **Système de défense secondaire** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (**Buettner**, 1993).

Tableau 6 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
(Koechlin-Ramonatxo, 2006).

| Principaux nutriments Antioxydants | Sources alimentaires |
|--|---|
| Vitamine C | Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron |
| Vitamine E | Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix. |
| β-carotène | Légumes et fruits orangés, et vert foncés |
| Sélénium | Poissons, œufs, viande, céréales, volaille |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers |
| Flavonoïdes | Fruits, légumes, thé vert |
| Acides phénoliques | Céréales complètes, baies, cerises |
| Tanins | Lentilles, thé, raisins, vin |
| Métabolisme de cystéine, glutathion | Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande |

Chapitre IV

Activité

antimicrobienne

CHAPITRE IV

Activité antimicrobienne

4.1. Généralités

Un microbe, ou micro-organisme, fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microbes sont indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments ainsi que des composants pharmaceutiques et industriels. D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Enfin les microbes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires (Nicklin *et al.*, 2000). La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

4.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité

bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (**Nauciel et Vildé.**, 2005).

4.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (**Prescott et al.**, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides». L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé. Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales (**Singh et Barrett**, 2006).

4.3.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (**Newman et al.**, 2003 ; **Singh et Barrett**, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes. Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962. La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium notatum*, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β -lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de β -lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les

carbapénèmes (**Singh et Barrett, 2006**). Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (**Laub, 1986**). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones) a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un antipaludéen en 1962. Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques. Découverte en 1979, celle-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années (**Singh et Barrett, 2006**).

4.3.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'antibiotique inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'antibiotique provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide (**Haddouchi et al., 1999**).

➤ L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées. L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'a plus des germes microbiens visibles (**Muanda, 2010**).

➤ L'effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'antibiotique utilisées in vivo ou in vitro; s'il persiste moins de 0.01% de survivants après 18 h de culture (**Muanda, 2010**).

4.3.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (Figure 7). Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (**Singh et Barrett, 2006**).

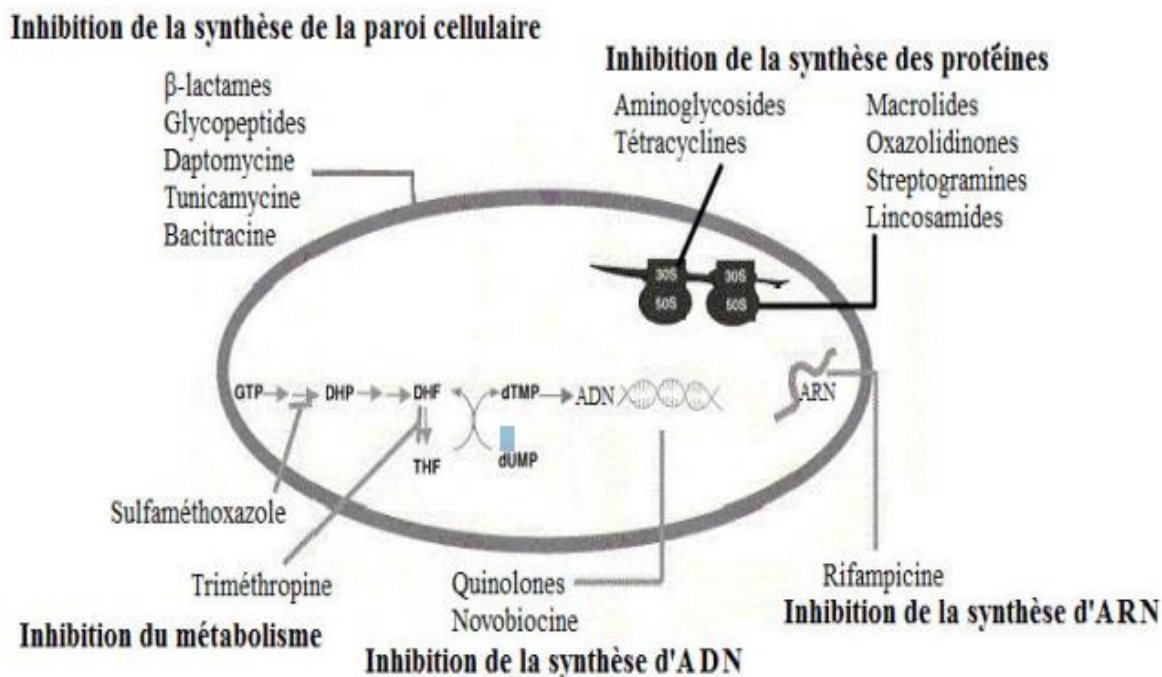


Figure 7: Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

4.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene et al., 2006). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux (Zhiri et Baudoux, 2005). Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre, sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol) qui, du fait de la présence des substituants phényle et hydroxyle, sont les plus actifs, s'en suit les aldéhydes, les cétones, les alcools et les terpènes (Dorman et Deans, 2000).

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (Guinoiseau, 2010).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (Burt,

2004). Cependant, les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique.

Les terpènes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema** et *al.*, 1994). Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite des ions intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de l'ATP, et du phosphate inorganique. Ceci va limiter la croissance bactérienne, mais si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraînera la mort cellulaire (**Carson** et **Riley**, 1995 ; **Tsuchiya** et *al.*, 1996 ; **Hammer** et *al.*, 1999).

Les huiles essentielles sont capables d'inhiber la production de toxines : soit à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice qui empêche l'exportation active des toxines hors de la cellule, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (**Ultee** et **Smid**, 2001).

Pour les levures, les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production des pseudo-mycéliums, alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Les extraits de plantes sont doués d'activités antimicrobiennes importantes, probablement dû à la présence des polyphénols. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les micro-organismes (**Scalbert**, 1991 ; **Cowan**, 1999). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique due à l'intercalation des polyphénols dans les phospholipides membranaires (**Daglia**, 2012).
- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (**Hilliard** et *al.*, 1995 ; **Zhang** et *al.*, 2009).
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Haraguchi** et *al.*, 1998 ; **Daglia**, 2012).
- Séquestration des substrats requis pour la croissance microbienne (**Milane**, 2004 ; **Daglia**, 2012).

4.5. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le micro-organisme (type, structure...) d'autre part (**Kalemba et Kunicka**, 2003).

4.5.1. Activité liée à la composition chimique

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique (**Lahlou**, 2004a). De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant il existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément (**Didry et al.**, 1993 ; **Lahlou**, 2004a). Et selon l'étude de **Lambert et al.**, (2001), l'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle.

Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures (**Cosentino et al.**, 1999 ; **Dorman et Deans**, 2000). Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (**Cox et al.**, 2000 ; **Lambert et al.**, 2001, **Burt et Reinders**, 2003). Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane (**Pibiri**, 2006). Cependant, il est à signaler que les phénols seuls ne sont pas responsables de l'intégralité de l'activité des huiles essentielles; les autres composés chimiques doivent également être pris en compte (**Cosentino et al.**, 1999). Les alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives, en dénaturant les protéines (**Dorman et Deans**, 2000). Les aldéhydes, fortement électronégatif à double liaison, deviennent de puissants agents antimicrobiens en réagissant avec les composés nitrés vitaux (protéines et acides nucléiques) des bactéries (**Desjobert et al.**, 1997 ; **Dorman et Deans**, 2000).

4.5.2. Activité liée au micro-organisme

Une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de micro-organisme (à Gram

positif ou à Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance. En effet, les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif (**Zaika**, 1988 ; **Santos** et **Novalés**, 2012). Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffère selon que la bactérie croît en forme planctonique ou au sein d'un biofilm bactérien. La résistance bactérienne aux huiles essentielles, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm. En effet, un isolat clinique récent peut montrer une résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte (**Alviano** et **Alviano**, 2009), tandis que les micro-organismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles (**Fine** et *al.*, 2001).

4.6. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon :

- Le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
- La nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, en puits, en solution alcoolique ou dispersion dans un émulsifiant.

Une première étape consiste à faire un « screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99.9% des micro-organismes après sous-culture sur milieu sans antibiotique (**Cosentino** et *al.*, 1999 ; **Andrews**, 2001).

4.6.1. Techniques de screening des huiles essentielles

4.6.1.1. Aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (**Girault et Bougeon**, 1971). Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose) de 6 mm sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (10 µl) (**Bondi et al.**, 1993). Après ensemencement et incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition.

4.6.1.2. Technique de diffusion en puits

Un puits (d'environ 6 mm) est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle pure ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées (**Dorman et Deans**, 2000).

Pour ces 2 techniques, la sensibilité du germe testé peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (**Duraffourd et al.**, 1990).

4.6.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles

4.6.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide

L'huile essentielle est mélangée aux concentrations désirées avec le milieu gélosé liquéfié par simple agitation manuelle. Après refroidissement, on ensemence et on incube (**Taudou**, 1990). L'adjonction d'un émulsifiant (Tween 80), inerte, stable et dépourvu d'action synergique antibiotique, peut être réalisée pour améliorer la solubilité de l'huile essentielle et sa diffusion dans la gélose (**Perruci et al.**, 1994). Ainsi, l'huile essentielle est préparée dans une solution de Tween 80 à la concentration désirée. Le mélange est agité manuellement pendant 10 minutes, puis ajouté au milieu gélosé liquéfié. L'ensemble est coulé en boîte de pétri. L'ensemencement est effectué après refroidissement de la gélose.

4.6.2.2. Techniques de diffusion en milieu liquide

4.6.2.2.1. Test de microdilution

L'incorporation de l'huile essentielle dans le milieu de culture liquide se fait en utilisant un émulsifiant (Tween 80) pour préparer les solutions de l'huile essentielle à la concentration désirée (**Carson et Riley**, 1995). La détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle se fait au moyen d'une microplaque de 96 puits. La détermination de la CMI est réalisée en faisant appel à un indicateur de croissance en solution (Triphényl Tétrazolium Chloride) (TTC). La croissance bactérienne est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge de la solution témoignant de la réduction ou la précipitation du TTC. La CMI est ainsi déterminée par le dernier puits de la microplaque, par ordre décroissant de concentration, qui ne montre aucun changement de couleur. La CMB est calculée en transportant 10 µl des puits ne montrant pas de croissance bactérienne sur un milieu solide. La plus faible concentration tuant 99.9% des micro-organismes en culture sur ce milieu correspond à la CMB.

4.6.2.2.2. Test de macrodilution

Le principe est le même que celui du test de microdilution, sauf qu'il est effectué dans des tubes contenant l'huile essentielle, à différentes concentrations, incorporée dans un bouillon de culture liquide (**Onawunmi**, 1989). La CMI est déterminée au niveau du dernier tube ne montrant aucune croissance microbienne visible.

4.6.2.3. Techniques de diffusion en phase vapeur

4.6.2.3.1. Méthode des micro-atmosphères

Le disque imprégné d'essence est disposé au centre géométrique du couvercle de la boîte de pétri et non plus au contact avec la gélose (**Kellner et Kobert**, 1954). La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte. La lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halo qui sera mesuré par un pied à coulisse. Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles, elle met en évidence seulement la sensibilité du micro-organisme testé aux constituants volatils à la température d'incubation.

Chapitre V

*Présentation du modèle
d'insecte étudié*

CHAPITRE V

Présentation du modèle d'insecte étudié : *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775)

5.1. Position systématique

C. maculatus est une espèce cosmopolite, originaire du continent Africain (Southgate, 1964 in Delacruz Perez et al., 2013). C'est en 1775 que Fabricius a décrit pour la première fois la bruche du niébé sous le nom de *Bruchus maculatus*. Elle fût également inventoriée sous plusieurs noms: *Bruchus quadrimaculatus* (Fabricius, 1792), *Callosobruchus ornatus* (Boheman, 1829), *Pachymerus quadrimaculatus* (Fabricius, 1905), mais le nom scientifique préféré demeure *C. maculatus*. Cette dernière est communément appelée bruche à 4 tâches ou bruche maculée. Les anglo-saxons l'appellent cowpea weevil. Actuellement, la classification phylogénétique a tendance à classer les bruches dans la famille des Chrysomelidae (Kergoat et al., 2007). Selon Southgate (1979), la position systématique de *C. maculatus* est la suivante:

Embranchement : Arthropodes

Sous embranchement : Hexapode

Classe : Insectes

Sous classe : Ptérygotes

Ordre: Colleoptéra

Sous ordre: Phytophagoida

Famille: Chrysomelidae

Sous famille: Bruchinae

Genre: Callosobruchus

Espèce: *Callosobruchus maculatus* (F., 1775)

5.2. Description

C'est un insecte de petite taille (2.8-3.5 mm) ; dont le corps est de forme oblongue (Figure 8) de couleur brun rougeâtre à gris, les femelles ont une taille plus importante que les mâles. A l'état adulte, *C. maculatus* est une espèce dimorphique. Il existe deux formes en fonction de la coloration et les motifs des élytres et du pygidium, l'aptitude au vol et la fécondation, ce sont la forme volière ou active et la forme non volière ou normale (Caswell, 1961 ; Utida, 1981).

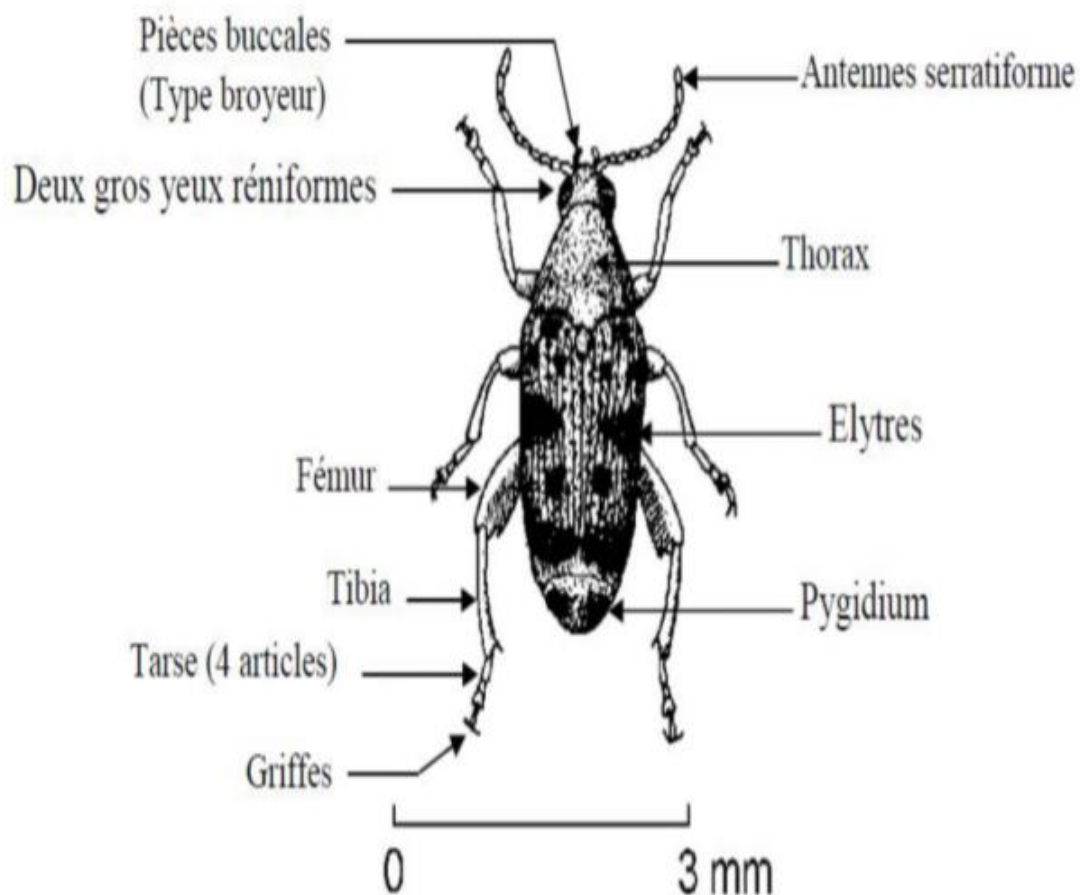


Figure 8: Adulte de *C. maculatus* avec ses différentes parties (Rees, 1996).

La forme volière ou active à fécondité faible (10 à 15 œufs) par femelle (Glitho et al. 1988 ; Delobel et Tran, 1993). Elle est capable de voler et responsable de l'infestation dans les cultures. Généralement elle est grande de taille et la coloration rousse est souvent absente ; les facteurs déterminant l'apparition de cette forme (température, qualité du substrat trophique humidité des graines ...) (Ouedrago et al., 1996).

La forme non volière ou normale; à fécondité élevée, elle est caractérisée par son incapacité au vol due à ses muscles alaires atrophiés (Ouedrago et al., 1996), cette forme est adaptée aux condition de stockage.

5.3. Cycle de développement

Le cycle de développement de *C. maculatus* est en fonction de la température et de l'humidité du milieu (Figure 9). Après l'accouplement, les femelles pondent sur les gousses en voie de maturation ou directement sur les graines. Les œufs pondus seront fixés par les femelles avec une substance gélatineuse, lors de la ponte, une phéromone de marquage est déposée en même temps que l'œuf, elle permet à la femelle d'éviter les grains fortement infestés, et de réduire ainsi les compétitions interlarvaire (Delobel et Tran, 1993). La moyenne des pontes varie entre 75 et 100 œufs par la femelle.

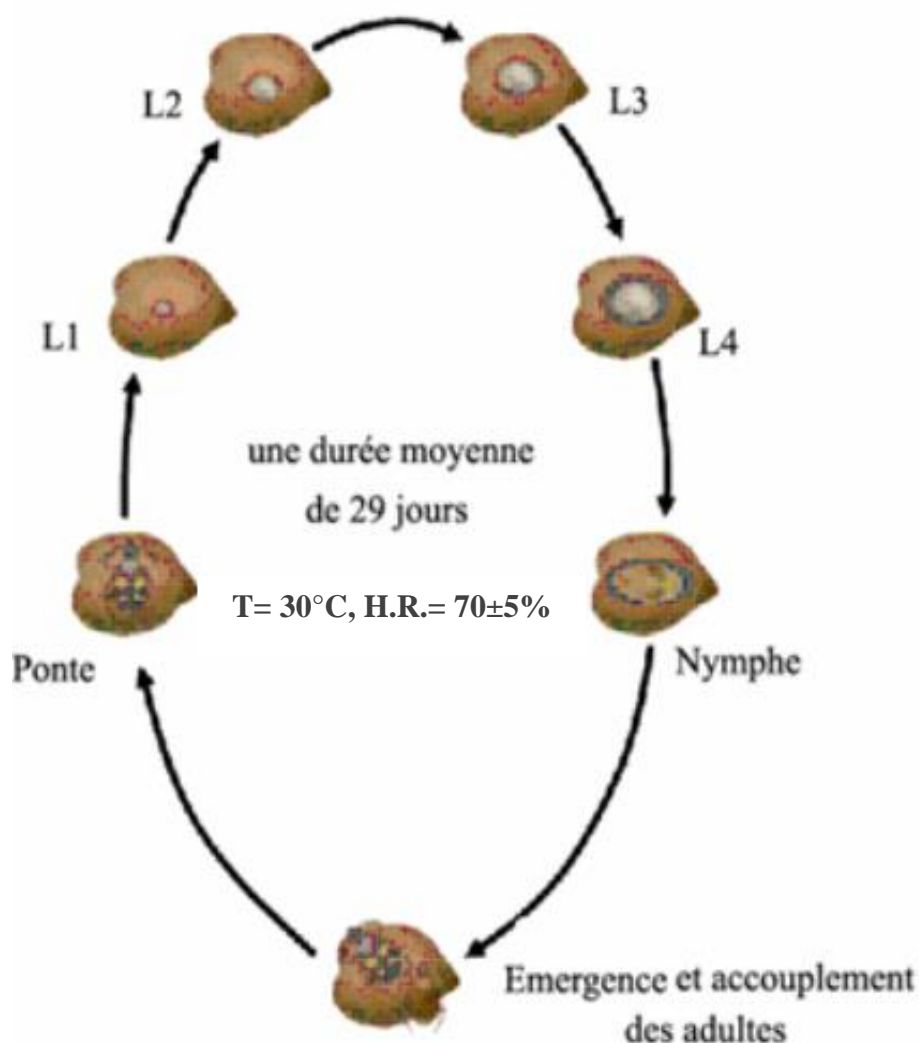


Figure 9 : Cycle de développement de *C. maculatus* (Mouhouche, 2005).

L'éclosion des œufs survient 5 à 7 jours après la ponte dans les conditions favorables, la larve qui ne possède pas encore de pattes motrices perce la paroi externe de l'enveloppe de la gousse ou du tégument de la graine et rentre à l'intérieur (**Fox**, 1994).

La larve peut accéder directement aux réserves nutritives de la graine au niveau des gousses, la jeune larve peut échouer dans le vide (espace inter-grain) ou déboucher, au cours de son transit trophique, sur un petit grain à faible réserve ne pouvant lui permettre d'atteindre le stade final de développement. Selon **Kellouche** (2005), le développement larvaire dure environ 15 jours (Larve du 1^{er} stade : 2 jours ; Larve du 2^{ème} stade : 2 jours ; Larve du 3^{ème} stade : 6 jours ; Larve du 4^{ème} stade : 5 jours).

La nymphose dure 7 jours chez *C. maculatus* (**Delobel** et **Tran**, 1993). Elle se déroule à l'intérieur d'un seul grain. L'adulte émerge dans la graine pour commencer un nouveau cycle de vie après avoir traversé la fenêtre de la sortie préparé par la larve.

5.4. Dégâts causés par *Callosobruchus maculatus*

Les insectes de la famille des Bruchidae constituent sans aucun doute une des contraintes majeures au développement des cultures de légumineuses à graines. De nombreuses études réalisées dans plusieurs pays africains ont montré que pendant l'entreposage du niébé, le taux d'infestation initial par les bruches est généralement inférieur à 5% (**Ouedraogo**, 1991; **Sanon** et *al.*, 2005). Ce taux passe à 30% après 1 mois, puis 80 à 100% en l'espace de 5 à 6 mois de stockage (**Glitho**, 1990 ; **Ouedraogo** et *al.*, 1996 ; **Tapondjou** et *al.*, 2002). L'ampleur des dégâts occasionnés par *C. maculatus* est fonction du niveau d'infestation initiale, de la durée et des techniques de stockage. Les dégâts causés par *C. maculatus* sont dus exclusivement aux larves qui dévorent les réserves du cotylédon des graines. Les signes d'infestation sont les trous de sortie des insectes ayant un diamètre de 2.5 mm (**Kellouche**, 2005). La bruche du niébé cause non seulement une réduction directe du poids sec, mais également une diminution de la viabilité des semences et de la qualité marchande et nutritionnelle des graines, suite au développement de moisissures qui les rendent impropres à la consommation humaine (**Bischoff**, 1992; in **Kellouche**, 2005). Les graines infestées sont contaminées par les déchets déposés par les insectes et une teneur en poussière accrue. En outre, au cours de leur développement, les larves de bruches éliminent l'azote sous forme d'acide urique toxique qui s'accumule à l'intérieur des graines (**Ndoutoume-Ndong** et **Rojas-Rousse**, 2007). Les graines percées sont souvent décolorées et dégagent une odeur

déplaisante. L'effet combiné des différents dégâts peut occasionner une perte totale de la production. *C. maculatus* constitue donc un frein majeur à la consommation et au développement de la production du niébé. Afin de protéger et de conserver ces graines, une approche de lutte intégrant plusieurs méthodes tant traditionnelles que modernes est donc plus qu'indispensable.

5.5. Méthodes de lutte contre les insectes des denrées stockées

La protection des denrées stockées contre les attaques d'insectes soulève des problèmes variés et elle doit faire appel à un ensemble de techniques différentes qu'il est nécessaire d'appliquer à bon escient. Le souci majeur d'un stockeur est de garder son stock de grain ou graine intact. Un ensemble de mesure préventive et curative, il s'agit de toutes techniques destinées à réduire l'infestation au champ, au début du stockage ainsi que pendant le stockage.

5.5.1. Lutte chimique

Avec le développement de la chimie, on s'est vite rendu compte qu'il y avait tout un arsenal capable d'éliminer les ennemis de l'homme. Cette approche a conduit à une élimination spectaculaire, du moins à court terme, des organismes nuisibles, et à une détérioration parallèle, mais pas nécessairement visible de la qualité de l'environnement. Depuis la venue des composés organiques de synthèse, on regroupe les insecticides en insecticides organiques (les organophosphorés, carbamates et pyrèthriinoïdes représentent la grande majorité des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement) (**Regnault Roger**, 2005). La lutte chimique largement répandue, en raison de son efficacité, doit être appliquée avec discernement pour limiter les risques qu'elle peut faire courir aux consommateurs des denrées. Deux types de traitement sont généralement employés :

- **Traitement par contact** : Il consiste à recouvrir les grains, l'emballage ainsi que les locaux de stockage d'une pellicule de produit insecticide qui agit par contact sur les prédateurs, dont l'effet est plus ou moins rapide avec une rémanence d'action plus longue.

- **Traitement par fumigation** : La fumigation consiste à traiter les grains à l'aide d'un gaz toxique, qu'on appelle fumigant. L'intérêt majeur de la fumigation est de faciliter la pénétration des gaz à l'intérieur du grain et donc de détruire les œufs, larves et nymphes qui s'y développent (**El Lakwah**, 1999 ; **Wang et al.**, 2006 ; **Shi**, 2012).

A cause de leur effet négatif sur l'environnement, l'utilisation des insecticides chimiques est devenue de plus en plus restrictive (**Rousseau et al.**, 2008). L'utilisation intensive des insecticides de synthèse pour lutter contre les insectes phytophages a conduit à la contamination de la biosphère. Selon **Philogène** (2005), tous les pesticides posent un problème de contamination à court ou à long terme, selon la nature de la molécule utilisée dans les traitements et selon la manière avec laquelle ils sont appliqués. Les études consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement (**Gregor et Gummer**, 2005).

L'utilisation des insecticides chimiques conduit aussi à un désordre écotoxicologique qui est accompagné d'une augmentation spectaculaire du nombre d'espèces devenues résistantes aux insecticides chimiques (**Nakakita et Winks**, 1981). Une dégradation naturelle et spontanée des pesticides chimiques est extrêmement rare, la cinétique de disparition par voie biologique d'un pesticide dans le sol débute toujours par une période de latence, plus au moins longue, au cours de laquelle la dégradation est pratiquement nulle. Tous ces produits phytosanitaires ont une caractéristique en commun : ils sont neurotoxiques. Des résidus de pesticides ont été détectés dans de nombreux secteurs de la chaîne alimentaire : il a été prouvé que le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) a une demi-vie de 10 ans dans l'eau et de 40 ans dans le sol exposé (**Hrdina et al.**, 1975).

5.5.2. Lutte physique et mécanique

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de rendre le stock sain. En général, ces techniques ne sont pas efficaces contre les formes cachées. Elles sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus chimiques liés aux différents traitements chimiques appliqués aux denrées stockées. Ainsi plusieurs techniques ont été expérimentées et ont eu des succès divers : l'écrasement mécanique dans les « Entoleter », le traitement par le froid et le chaud, le stockage étanche ou sous atmosphère contrôlée et les radiations ionisantes (**Benayad**, 2013).

La lutte par le froid consiste à abaisser la température de stockage, ce qui entraîne un ralentissement du développement des insectes, freiné dès que la température est inférieure à 10°C. La température insecticide est de 5°C.

La lutte par la chaleur consiste à une élévation de la température (température supérieure à 50°C), ce qui entraîne la mort des insectes. Le passage des produits dans un séchoir permet d'éliminer les insectes présents dans les grains.

5.5.3. Lutte biologique

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de prédateurs, de parasitoïdes, de micro-organisme et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides (**Tietze et Modi**, 2000). Le concept de lutte biologique a subi une évolution au cours du temps et intègre dans sa définition actuelle toutes les formes non chimiques de contrôle des ravageurs des récoltes. Les lieux de stockage représentent des systèmes stables, avec des niveaux déterminés de température et de l'humidité, parce qu'ils forment des enceintes closes, ce qui est favorable pour procéder à une lutte biologique. L'utilisation des phéromones d'insectes attractifs et répulsifs d'alimentation est d'un haut niveau de détection. Ils peuvent être employés comme indicateur des époques d'application des méthodes de lutte contre certains ravageurs des denrées stockées. Ainsi, la lutte par les insecticides botaniques est très recommandée, parmi les moyens mis en œuvre par les plantes pour se défendre contre leurs déprédateurs, les médiateurs chimiques jouent un rôle déterminant (**Prates et al.**, 1998).

Dans le bassin méditerranéen, on rencontre un très grand nombre de plante aromatique. Son climat riche en luminosité et en chaleur, qu'accompagnent des saisons marquées, exige de la part des plantes des efforts adaptatifs favorable à une richesse moléculaire évolutive leur conférant de multiples propriétés, entre autre l'effet insecticide (**Penoel**, 1994). Les espèces de la famille de Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Lamiaceae et Canellaceae sont les principales familles les plus prometteuses comme source de bioinsecticides (**Jacobsen**, 1989). Parmi plusieurs huiles essentielles, celles de la famille des Lamiaceae ont reçu une attention considérable dans la recherche des produits naturels pour lutter contre les ravageurs des denrées stockées (**Mansour et al.**, 1986 ; **Tunçw et Sahinkaya** 1998 ; **Isman**, 2000 ; **Lee et al.**, 2000). La même famille a fait l'objet de plusieurs études et ils ont montré que les espèces aromatiques sont les plus utilisées pour lutter contre les insectes (**Shaaya et al.**, 1997). Selon les ressources disponibles et la pression exercée par les phytophages, les familles des plantes développent des quantités différentes de leurs ressources à leur protection. Cependant, grand

nombre d'entre elles n'a pas encore fait l'objet d'étude tant sur le plan phytochimique que sur le plan propriété insecticide. Un examen systématique des découvertes phytochimiques répertoriées, en utilisant la base de données NAPRALERT (Natural Products Alert Database), révèle que seulement 2 à 5% des espèces végétales ont été examinées en détail d'un point de vue phytochimique (**Akerele**, 1984). Une étude réalisée par **Balick** et *al.* (1996), a montré que moins de 1% des plantes tropicales sont étudiées d'un point de vue phytochimique. La voie donc, reste ouverte vers la découverte de nouvelles plantes et par la suite de nouvelles molécules à effet phytoinsecticide. Selon **Regnault-Roger** et **Hamraoui** (1997), les plantes les plus efficaces appartiennent à la famille des Lamiaceae. Les principaux extraits aqueux d'origine végétale utilisés contre les ravageurs des grains stockés sont: les extraits de pyrèthre (Asteraceae), de neem (Melicaceae), de poivron (Solanaceae) et les racines d'*Annona* (Annonaceae) (**Gwinner** et *al.*, 1996).

Les huiles essentielles sont connues depuis fort longtemps pour leurs vertus médicinales (antiseptique et antifongique). Peu à peu, elles ont constitué un remarquable outil de défense contre les insectes nuisibles en général et ceux des denrées stockées en particulier (**Keita** et *al.*, 2001). Les plantes insecticides, à travers notamment leur huile essentielle, peuvent limiter la dépendance des paysans aux insecticides chimiques de synthèse. L'analyse chromatographique de quelques huiles essentielles révèle qu'elles renferment majoritairement des monoterpènes hydrocarbonés, composés volatiles qui leur allouent des propriétés insecticides. La toxicité de nombreuses huiles essentielles et de leurs constituants a été appréciée sur de nombreux ravageurs des graines. Ainsi, les huiles essentielles de *Laurus nobilis* (Lauraceae), d'*Origanum glandulosum* (Lamiaceae), de *Clausena anisata* (Rutaceae), de *Salvia verbenaca* (Lamiaceae), d'*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) ont montré une activité insecticide à l'égard de *Rhyzopertha dominica*, de *Tribolium castaneum*, de *Bruchus rufimanus*, de *Callosobruchus chinensis* et de *C. maculatus* (**Ndomo** et **Ngamo**, 2008 ; **Kellouche** et *al.*, 2010; **Mediouni-Benjema** et *al.*, 2012 ; **Righi** et *al.*, 2014).

2^{ème} Partie

Etude

expérimentale

Chapitre I
Matériel
et
méthodes

CHAPITRE I

Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

Notre étude porte sur deux espèces végétales appartenant à la famille des Lamiaceae, à savoir la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) et la germandrée tomenteuse (*Teucrium polium* L.), qui ont été récoltées respectivement dans les régions d'**Ain Defla** (latitude 36° 15' 55" (N), longitude 1° 58' 13" (E), altitude 980 m) et d'**Oum El Bouaghi** (latitude 35° 52' 39" (N), longitude 7° 6' 49" (E), altitude 891 m) durant les mois de Mars-Avril 2015 au stade floraison. Les parties aériennes fleuries des deux plantes (feuilles, fleurs et tiges) ont été séchées pendant quinze jours à température ambiante (25-30 ° C) à l'abri de la lumière.

1.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation assistée par ultrasons

1.2.1. Protocole d'extraction

L'extraction des huiles essentielles à partir des deux plantes étudiées est effectuée par le procédé d'hydrodistillation assistée par ultrasons, au laboratoire de génie alimentaire de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach), par le biais d'un appareil de type Clevenger modifié. Dans cette étude, les ultrasons sont utilisés comme prétraitement avant l'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* par hydrodistillation conventionnelle. Le procédé de sonication est réalisé en utilisant un bain à ultrasons (Fisher bioblock Transonic TI-H, 25-45 KHz) (Figure10).

Le principe de l'extraction assistée par ultrasons est de générer une bulle de cavitation à proximité de la cellule végétale pour provoquer sa rupture sans dégrader les produits libérés.

Pour chaque extraction, une prise d'essai d'environ 100 g de la matière végétale sèche est broyée, divisée en quantité égales de 25 g et placée dans 4 béchers. Dans chaque bécher, l'échantillon en poudre est mélangé avec 50 ml d'eau distillée. Les 4 béchers avec leur contenu sont placés dans le bain à ultrasons et soumis aux ondes ultrasonores dans les conditions opératoires suivantes: fonction Degas, fréquence de 25 KHz, température de 25° C, durée de 15 min et puissance ultrasonique de 20, 40 et 60 W.

Après chaque prétraitement, le mélange contenu dans les béchers est placé immédiatement dans un ballon à fond rond (2000 ml) et un volume d'eau distillée est versé de manière à respecter le rapport matériel végétal/eau suivant: 1 : 4, 1: 8 et 1:12 g/ml. Enfin, le mélange est hydrodistillé selon la **Pharmacopée Européenne** dans un appareil de type Clevenger modifié pendant une durée de 30, 60 et 90 min à partir du moment de l'extraction de la première goutte d'huile essentielle. Le ballon chauffé à l'aide d'une calotte chauffante produit de la vapeur qui se charge de produits volatils qu'elle entraîne avec elle. Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant.



Figure 10 : Bain à ultrasons.

1.2.2. Récupération, séchage et conservation des huiles essentielles

Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter où l'on sépare par différence de densité la phase aqueuse de la phase organique (phase supérieure) qui constitue l'huile essentielle. L'huile essentielle qui était un mélange des huiles obtenues à partir des différentes distillations a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}$) et conservée à une température de 4°C dans un flacon sombre fermé hermétiquement en vue de son analyse.

1.2.3. Optimisation par la méthode des surfaces de réponse

La méthode des surfaces de réponse est un ensemble de technique mathématiques qui se base sur la conception expérimentale pour déterminer la portée des variables d'entrée indépendantes. Cette méthode permet, grâce à des modèles mathématiques empiriques, de déterminer une relation d'approximation entre les réponses de sortie et le variables d'entrée pour optimiser les paramètres du procédé afin d'atteindre des réponses souhaitables. Dans cette méthode, la réponse peut s'écrire sous la forme suivante :

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k) + \varepsilon$$

où f est la fonction-réponse qui dépend des variables aléatoires x_i indépendantes ; ε est un terme qui représente d'autres sources de variabilité.

Dans notre étude, la réponse de sortie est le rendement en huile essentielle. Les variables indépendantes d'entrée sont le temps d'extraction, la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau.

Nous avons utilisé la méthode des surfaces de réponse pour optimiser les conditions opératoires du processus d'hydrodistillation assistée par ultrasons des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*. Nous avons choisi un plan d'expérience basé sur la méthode de **Box-Behnken** (1960) permettant de faire varier les principaux facteurs de l'extraction des huiles essentielles afin de choisir un optimum grâce à un modèle quadratique.

Les niveaux des différentes variables du processus d'extraction des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Teucrium polium* sont indiqués dans le Tableau 7.

Tableau 7: Les niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan de Box-Behnken.

| Variables indépendantes | Rangs et niveaux | | |
|---|------------------|------|-------|
| | -1 | 0 | +1 |
| Temps d'extraction (X_1 , min) | 30 | 60 | 90 |
| Puissance ultrasonique (X_2 , W) | 20 | 40 | 60 |
| Rapport matière végétale/ eau (X_3 , g/ml) | 1 :4 | 1 :8 | 1 :12 |

1.2.3.1. Analyse statistique des données

Le comportement de la surface de réponse a été expliqué par un modèle polynomial complet de second ordre selon l'équation suivante (Khuri et Cornell, 1996) :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

où Y est la réponse (rendement en huile essentielle) et $b_0, b_1, b_2, \dots, b_{23}$, sont respectivement les coefficients, linéaire, quadratique et d'interaction. X_1, X_2 et X_3 sont les variables codées indépendantes (Montgomery, 2005 ; Bradley, 2007).

Ce type de modèle permet l'estimation d'une surface de réponse pour étudier les effets linéaires, les effets quadratiques et les effets d'interaction.

Le logiciel **Design Expert 10.0.6** (State-Ease, Inc.) est utilisé pour déterminer les coefficients des polynômes de la réponse. Le degré de signification des coefficients est déterminé à l'aide du test de Fisher et de la valeur de p. La vérification des modèles ajusté est réalisé par le coefficient de régression R^2 et leurs signification statistique est faite par le t-test. Lorsque R^2 présente des valeurs élevées, il indique que le modèle prévoit correctement les nouvelles observations et que le modèle ajuste bien les données existantes. La qualité du modèle ajusté a été évaluée par l'analyse de variance (ANOVA) (Tableau 8).

Tableau 8 : Forme générale des résultats de l'analyse de la variance.

| Sources de variances | ddl | Somme des carrés des écarts | Carrés moyens | F_{obs} | Probabilité P | Source influente ? |
|----------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| Facteur l | ddl_l | SCE_l | $CM_l = SCE_l / ddl_l$ | CM_l / CM_r | $P(F \geq F_{obs})$ | $P < \alpha$ |
| Facteur f | ddl_f | SCE_f | $CM_f = SCE_f / ddl_f$ | CM_f / CM_r | | |
| Facteur k | ddl_k | SCE_k | $CM_k = SCE_k / ddl_k$ | CM_k / CM_r | | |
| Interaction fg | ddl_{fg} | SCE_{fg} | $CM_{fg} = SCE_{fg} / ddl_{fg}$ | CM_{fg} / CM_r | | |
| Variation résiduelle | ddl_r | SCE_r | $CM_r = SCE_r / ddl_r$ | | | |
| Totaux | ddl_t | SCE_t | | | | |

1.3. Elaboration des extraits non volatils

1.3.1. Principe

Dans notre étude, six solvants (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, chloroforme, hexane et eau) ont été utilisés afin d'élaborer les différents extraits non volatils des deux plantes investiguées. Les différents extraits ont été obtenus en utilisant une extraction solide-liquide, par Soxhlet, réalisée au laboratoire de génie alimentaire de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach).

1.3.2. Mode opératoire

Les parties aériennes des plantes étudiées ont été broyées et réduites en poudre fine. 20 g de la poudre obtenue ont été placées dans une cartouche et soumises à une extraction avec 500 ml de solvant pure 99 %. L'extraction est répétée jusqu'à ce que le solvant récupéré devienne incolore. Après environ 6 heures d'extraction, le solvant riche en substances extraites, a été récupéré dans un ballon et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor). L'extrait ainsi récupéré a été placé dans un dessiccateur, pesé et conservé à 4-6 °C jusqu'à son utilisation.

1.4. Analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles

1.4.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1.4.1.1. Principe

L'analyse qualitative par CPG des huiles essentielles a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de Technologie Alimentaire de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach) en utilisant un appareil de type CP Chrompack 9002, équipé d'une colonne capillaire Stabilwax de phase stationnaire polyéthylenglycol (PEG) d'une longueur de **30** m ; d'un diamètre interne de **0.320** mm et d'une épaisseur du film de la phase de **0.25** µm et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de la colonne est programmée à **50** °C en isotherme pendant **3** min, puis augmentée à raison de **2** °C/min jusqu'à **220** °C, maintenue en isotherme pendant **15** min. Le volume injecté est de **0.2** µL. Le mode d'injection est split avec un rapport de division de **1/50**. L'azote a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de **1** ml/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur (FID) sont respectivement de **250** et **280** °C. La pression est de **30** K Pascal.

1.4.1.2. Mode d'identification

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention (indice de Kovats) en programmation de température à ceux cités par la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions (Adams, 1995). Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane (C₆ – C₂₄) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les indices de Kovats (**IK**) sont calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100 z + 100 n \cdot \frac{t_{Re} - t_{Rz}}{t_{Rz+n} - t_{Rz}}$$

t_{Re} : temps de rétention du composé étudié (min) ;

t_{Rz} : temps de rétention de l'alcane à **z** atomes de carbone qui précède le composé étudié (min) ;

t_{Rz+n} : temps de rétention de l'alcane à **z+n** atomes de carbone qui suit le composé (min) ;

n : différence des nombres d'atomes de carbone.

1.4.2. Analyse semi-quantitative des huiles essentielles par CG/SM

Cette analyse a été faite au laboratoire du Centre de Recherches en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) en utilisant un chromatographe en phase gazeuse de type **GC 6890** série GC systems couplé avec un spectromètre de masse (SM) de type **MS-5973 N** (HP Agilent Technologies). La fragmentation est effectuée par impact électronique à **70** ev sur une plage de balayage de **30-550** unités de masse atomique. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP5-MS (**5 %** phenylmethylpolysiloxane) d'une longueur de **30** m, d'un diamètre interne de **0.25** mm et d'une épaisseur du film de la phase de **0.25** μm . La température de la colonne est programmée à **35** °C en isotherme pendant **2** min, puis augmentée à raison de **5** °C/min jusqu'à **320** °C. Le gaz vecteur est l'Helium dont le débit est fixé à **1** ml/min. Le volume injecté est de **0.2** μL . L'injection a été faite en mode Split à une température de **250** °C. La température de détection est fixée à **280** °C. La pression est de **6.75** psi.

1.5. Dosage des composés phénoliques des extraits obtenus

1.5.1. Dosage des phénols totaux

Les phénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Singleton et al.**, (1999) utilisant l'acide gallique comme standard.

1.5.1.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique (Figure 11).

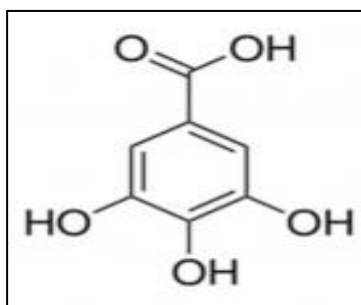


Figure 11 : Formule chimique de l'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

1.5.1.2. Mode opératoire

Un volume de 0.25 ml d'extrait dissout dans de l'éthanol est mélangé à 1.25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes de temps de réaction du mélange, 1 ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75 g/l est ajouté. Après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à une température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm. L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration d'extrait. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sera exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait.

1.5.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) modifiée (Lamaison et Carnet, 1990 ; Huang et al., 2004) a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits étudiés.

1.5.2.1. Principe

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes dont l'absorbance a été estimée à 420 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine (Figure 12).

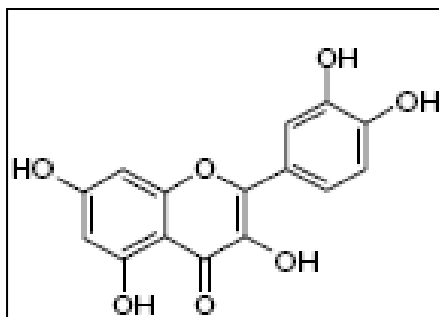


Figure 12 : Formule chimique de la quercétine.

1.5.2.2. Mode opératoire

1 ml d'extrait dissout dans de l'éthanol est ajouté à 1 ml de la solution éthanolique de chlorure d'aluminium. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm. Cette expérience est répétée trois fois. La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine et sera exprimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait.

1.6. Evaluation de l'activité antioxydante

Depuis ces dernières décennies, les tests d'activité antioxydante ont été largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés. De nombreuses méthodologies sont disponibles, permettant d'évaluer les différents aspects physico-chimiques du potentiel antioxydant dans différentes conditions. Tous les auteurs s'accordent qu'une seule procédure ne peut pas identifier tous les mécanismes caractérisant un antioxydant (**Hazzit et al.**, 2009). Par conséquent, les huiles essentielles et les extraits subissent un screening pour leur possible activité antioxydante en utilisant au moins deux essais ou méthodes complémentaires (**Turkmen et al.**, 2007 ; **Mariod et al.**, 2009). L'activité antioxydante est évaluée par les tests de piégeage des radicaux DPPH et ABTS^{•+} ainsi que par la mesure pouvoir réducteur.

1.6.1. Activité de piégeage du radical 2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl (DPPH)

1.6.1.1. Principe

L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical libre DPPH. Dans ce test, le piégeage du radical DPPH[•] est suivi par la diminution de l'absorbance à 517 nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant (AH) contenu dans les échantillons.

Le DPPH (Figure 13) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres.

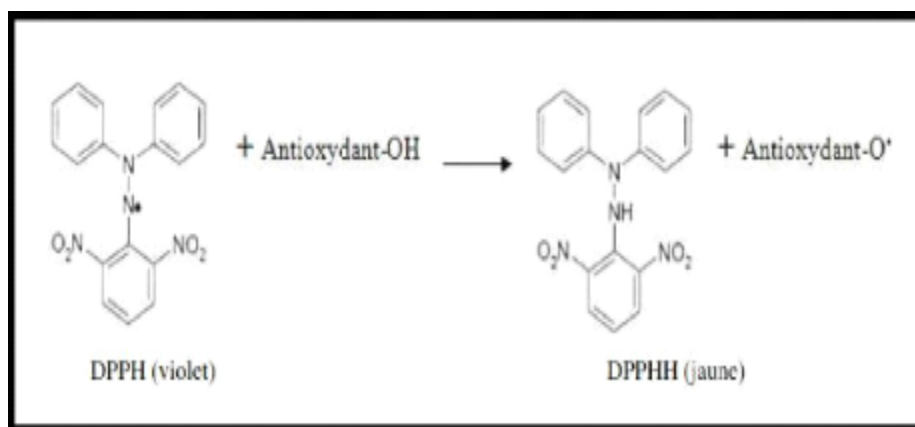


Figure 13 : Forme libre (violette) et réduite (jaune) du DPPH (**Brand-Williams et al.**, 1995).

1.6.1.2. Mode opératoire

Le test du DPPH a été réalisé dans un spectrophotomètre UV-visible de type UNICAM HELIOS λ à la longueur d'onde de 517 nm.

La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 60 μM dans de le méthanol absolu. Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Burits** et **Bucar** (2000), où 25 μl de chacune des dilutions de l'extrait testé sont mélangés avec 975 μl de la solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 min à la température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'activité antioxydante (AA%) est donné par la formule suivante :

$$\%AA = \frac{Abs\ blanc - Abs\ éch}{Abs\ blanc} \times 100$$

où:

A_{blanc} : Absorbance du témoin (Solution de DPPH) (517 nm) ;

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon.

1.6.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50})

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (huile essentielle, extrait ou toute autre substance antioxydante) nécessaire pour réduire 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (AA%) en fonction de la concentration de l'antioxydant (présent dans l'huile essentielle ou l'extrait). La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC_{50} est petite.

1.6.2. Activité de piégeage du radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acide (ABTS \bullet^+)

1.6.2.1. Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical cationique ABTS \bullet^+ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acide), qui présente un spectre d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS forme le radical ABTS \bullet^+ , de couleur bleue verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (Figure14).

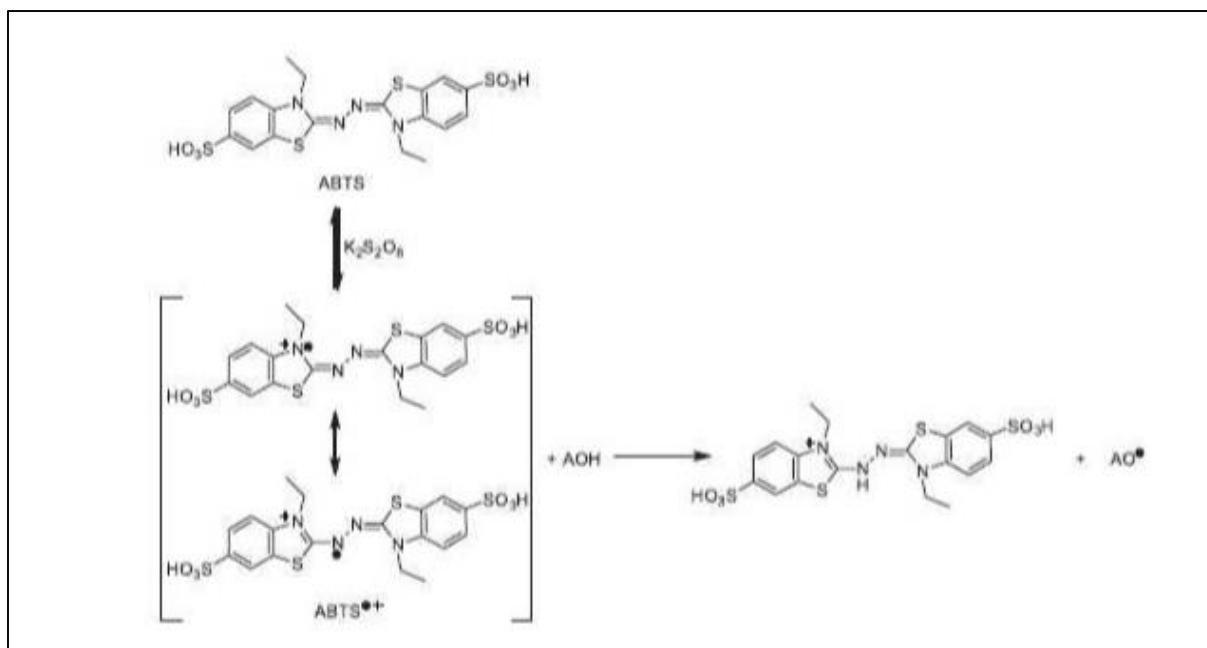


Figure 14 : Génération du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) (De Oliveira et al., 2014).

La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants. Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (H^{\bullet}), l'atome d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

2.1.1.1. Mode opératoire

Un stock d'une solution mère d' $ABTS^{\bullet+}$ stable est préparé en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium. Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisations. Cette solution est par la suite diluée avec le méthanol afin d'avoir une absorbance de 0.700 (± 0.02) à 734 nm. A 950 μ l de cette solution, 50 μ l d'HE ou d'extrait végétal ou de témoin positif (BHT) sont ajoutés, après 6 min on note l'absorbance obtenue à 734 nm en se référant à un témoin sans extrait. Les résultats permettent de calculer et d'exprimer cette activité anti-radicalaire en IC_{50} comme décrit précédemment pour le test DPPH.

Parce que ce test est simple, il est utilisé dans beaucoup de laboratoires pour l'étude de l'activité antioxydante. L' $ABTS^{\bullet+}$ réagit rapidement avec les antioxydants et peut être utilisé

sur une large gamme de pH. Il est soluble dans l'eau et les solvants organiques et n'est pas affecté par la force ionique, il peut donc déterminer la capacité antioxydante lipophile et hydrophile.

2.1.2. Mesure du pouvoir réducteur

1.6.3.1. Principe

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), donc la mesure de l'aptitude d'un extrait à interagir avec les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables. Il est basé sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) dans lequel la coloration jaune de la solution à tester change vers diverses nuances de couleurs vertes et bleues en rapport avec le pouvoir réducteur de chaque échantillon (**Hazzit et al.**, 2013). La présence d'agents réducteurs provoque la conversion du complexe Fe^{3+} / ferricyanure à la forme ferreuse qui peut être suivie à 700 nm grâce à la formation de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, de couleur bleu de Prusse. L'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique une augmentation de la capacité réductrice.

1.6.3.2. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles et des extraits testés est déterminé par la méthode d'**Oyaizu**, (1986). A 0.125 ml d'échantillon (dilué dans le méthanol) sont ajoutés 2.5 ml d'une solution tampon phosphate (0.2M, pH : 6.6) et 2.5 ml d'hexacyanoferrate de potassium, $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). Après incubation pendant 20 min à 50°C, 2.5 ml d'acide trichloroacétique (10%) sont additionnés. Le tout est centrifugé pendant 10 min à 1500 tr/min. On prélève ensuite 2.5 ml de la phase supérieure de chaque tube pour les transférer dans un autre tube aux quels on ajoute 2.5 ml d'eau distillée. Au moment de la lecture on ajoute 0.5 ml de chlorure ferrique FeCl_3 (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de méthanol. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation de la capacité réductrice (Figure 15).

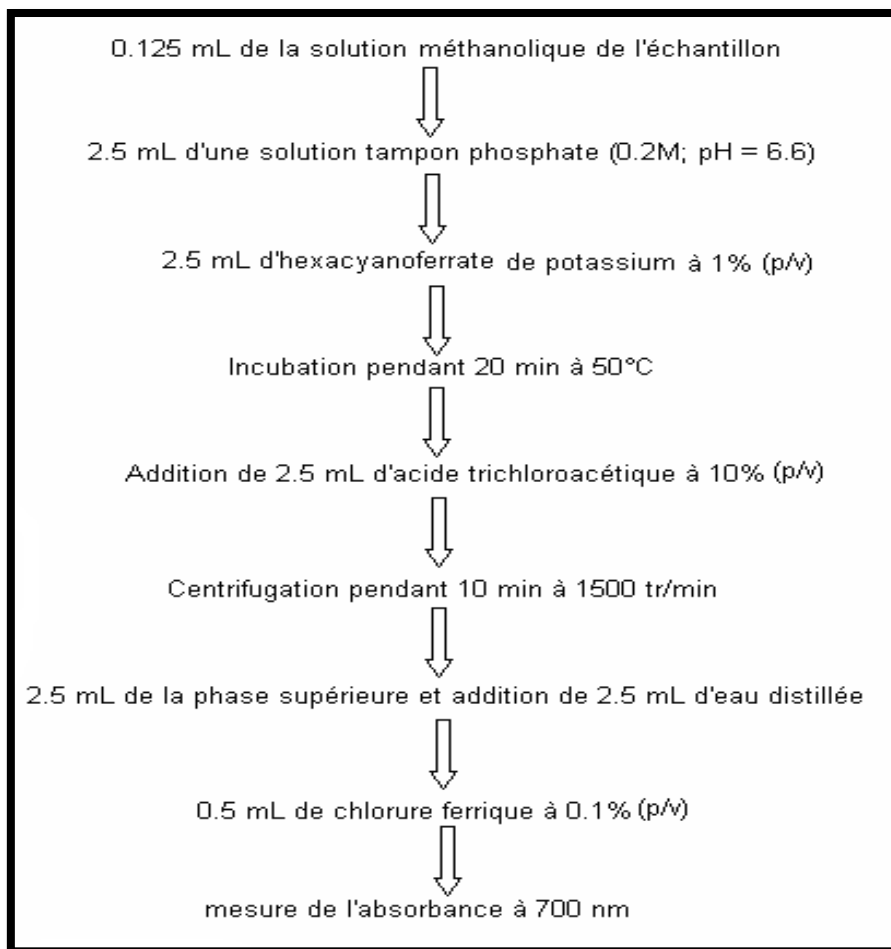


Figure 15 : Schéma du protocole expérimental de l'évaluation du pouvoir réducteur.

1.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne

1.7.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE et des extraits testés, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés aromagrammes. Les tests ont été réalisés au laboratoire de Biochimie de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach).

1.7.1.1. Principe

Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques « **Pharmacopée Européenne**, 2002 ». L'aromatogramme ou méthode de diffusion sur milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des micro-organismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne (Figure 16).

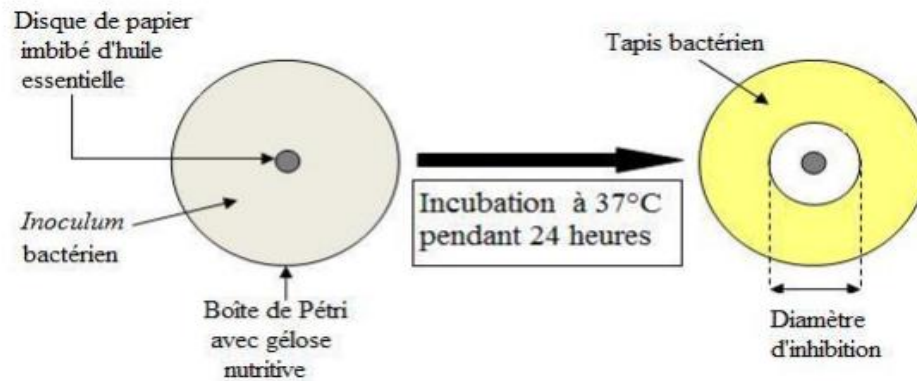


Figure 16: Principe de la méthode de diffusion sur disques.

1.7.1.2. Micro-organismes testés

L'activité antimicrobienne des HE et des extraits étudiés a été testée sur 4 micro-organismes (3 bactéries pathogènes et 1 levure), qui sont tous des souches pures et issues de la collection du *CRD-SAIDAL*. Le Tableau 9 illustre les principales infections causées par ces micro-organismes.

Tableau 9 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.

| Souche | N°ATCC | Gram | Famille | Principales infections causées |
|-------------------------------|--------|------|--------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 4157 | - | Enterobacteriaceae | - Diarrhées dysentériques ; - Gastro-entérites. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6538 | + | Micrococcaceae | - Gastro-entérites ; - Infections urinaires ; - L'ostéomyélite et l'arthrite. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9027 | - | Pseudomonadaceae | - Crampes abdominales ; - Troubles digestifs. |
| <i>Candida albicans</i> | 24433 | / | Cryptococcaceae | - Lésions cutanées ; - Infections œsophagiennes ; - Infections génitales. |

1.7.1.3. Protocole expérimental

1.7.1.3.1. Préparation de la première couche du milieu

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

1.7.1.3.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et de 48 h pour la levure, on réalise des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmittance qui doit être comprise entre 22 et 32% pour les bactéries et entre 2 et 3% pour la levure et cela à une longueur d'onde de 620 nm. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 germes/ml. Si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique (à 9% de NaCl) si elle est inférieure à la valeur minimale soit en ajoutant des colonies si elle est supérieure à la valeur maximale. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min suivant sa préparation.

1.7.1.3.3. Préparation de la deuxième couche du milieu

On fait fondre les deux milieux MH et SAB, on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45 °C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement, puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la paillasse.

1.7.1.3.4. Les huiles essentielles et les extraits utilisés

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles employées sont à l'état pur pour pouvoir les utiliser dans la technique de l'aromatogramme. Quant aux extraits non volatils, nous avons utilisé une concentration de 100 mg/l.

1.7.1.3.5. Dépôt des disques

A l'aide d'une micropipette, en utilisant des cônes stériles, on prélève 20 à 30 µl d'huile essentielle pure ou d'extrait, on dépose chaque quantité prélevée sur le disque (6 mm de diamètre) posé préalablement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose ensemencée, on laisse diffuser pendant 30 min. Et enfin, incuber à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure.

1.7.1.3.6. Lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque, en mm.

- Halos clairs autour du disque : présence d'une activité inhibitrice des HE et des extraits;
- Absence d'halos clairs autour du disque : pas d'effet inhibiteur des HE et des extraits.

L'interprétation des résultats obtenus se fait par le biais d'une échelle d'estimation du potentiel antimicrobien donnée par **Meena** et **Sethi** (1994) et **Ela et al.**, (1996), qui ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 4 classes (Tableau 10).

Tableau 10 : Type d'inhibition des souches microbienne en fonction des diamètres de la zone d'inhibition.

| Type d'inhibition | Zone d'inhibition |
|------------------------|--------------------------|
| Non inhibitrice | diamètre < 10 mm |
| Légèrement inhibitrice | 10 mm ≤ diamètre < 16 mm |
| Modérément inhibitrice | 16 mm ≤ diamètre < 28 mm |
| Fortement inhibitrice | diamètre ≥ 28 mm |

1.7.2. Etude quantitative : détermination de la CMI et CMB

1.7.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

1.7.2.1.1. Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24h pour les bactéries et 48h pour la levure. Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents antimicrobiens en l'occurrence les

huiles essentielles et les extraits testés. Cette CMI est déterminée selon la méthode des dilutions sur milieu gélosé : MH pour les bactéries et SAB pour la levure.

1.7.2.1.2. Protocole expérimental

a- Préparation de l'inoculum microbien

A partir d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et de 48h pour la levure, on prépare les solutions mères des souches à étudier en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm, qui doit correspondre à une DO entre 0.2 et 0.3 pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, à une DO entre 0.3 et 0.4 pour *Staphylococcus aureus* et une DO comprise entre 2-3 pour *Candida albicans*.

Préparer une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} , en prélevant 1 ml de la solution mère auquel on ajoute 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10^{-2} , procédé de la même façon jusqu'à la dilution 10^{-4} , c'est cette dernière qui sera utilisée pour la détermination de la CMI.

b- Préparation des dilutions d'HE et d'extrait de 2% à 0.03%

On prépare une dilution d'HE ou d'extrait à 2%, en diluant 1 ml d'HE pure (100%) ou d'extrait (100 mg/l) dans 50 ml de milieu (MH et/ou SAB) liquide additionné de Tween 80 stérile dans le premier flacon. On réalise des dilutions de $\frac{1}{2}$ au $\frac{1}{2}$, en versant la moitié de la dilution 2% dans le deuxième flacon et compléter avec 25 ml de milieu ce qui donne la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%. Couler chaque dilution dans les boîtes de pétri, laisser solidifier (pour les bactéries chaque boîte est divisée en trois correspondants aux trois souches bactériennes testées).

NB : - Un témoin positif ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 plus 3µl d'inoculum est prévu pour chaque série de dilution d'HE ou d'extrait.

- Un témoin négatif ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 est également prévu.

c- Incubation

Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure.

d- Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice d'HE, se traduisant par l'absence toute croissance bactérienne visible.

1.7.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

1.7.2.2.1. Principe

Le caractère bactéricide des HE et des extraits est étudié par la détermination de la CMB qui correspond à la concentration minimale en HE ou extrait pour obtenir la destruction de 99.99% de l'inoculum initial (moins de 0.01% de survivants) en 24h pour les bactéries et 48h pour la levure.

1.7.2.2.2. Protocole expérimentale

La détermination de la CMB se fait comme suit :

- À partir de la CMI déterminée pour les deux HE et les différents extraits, on prélève les disquesensemencés qu'on va repiquer sur milieu TSA et/ou SAB en utilisant la même gamme de concentration utilisée pour l'évaluation de la CMI.
- Incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour la levure.
- La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration d'HE ou d'extrait se traduisant par l'absence de toute croissance microbienne visible.
- Pour chaque expérience trois répétitions ont été réalisées.

NB : Le rapport d'activité CMB/CMI est également déterminé.

1.8. Evaluation de l'activité insecticide

1.8.1. Matériel biologique

1.8.1.1. Matériel végétal

Les huiles essentielles et les extraits utilisés pour réaliser les différents essais insecticides sont obtenus à partir des plantes décrites dans le paragraphe 1.1 du matériel et méthodes.

1.8.1.2. Matériel entomologique

L'élevage de masse des adultes de *Callosobruchus maculatus* (F.) a été réalisé au laboratoire de phytopharmacie du département de Zoologie agricole de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach). La multiplication de ces insectes est conduite dans des bocaux en verre d'une capacité de 1 litre contenant chacun 100 g de graines de pois chiche saines (Figure 18). Chaque bocal est infesté par 20 couples de bruches afin d'assurer une reproduction rapides. Les bocaux sont placés dans une étuve obscure réglée à une température de 28 ± 2 °C et une humidité relative de $70 \pm 5\%$, favorables au développement de ces insectes. Les bruches utilisés pour l'expérimentation, dont l'âge est connu, sont obtenus par tamisage des graines de pois chiches.



Figure 18 : L'élevage de masse des insectes dans des bocaux en verre placés dans une étuve réglée à une température de 28 ± 2 °C et une humidité relative de $70 \pm 5\%$.

1.8.2. Choix des doses

Les doses utilisées ont été fixées sur la base des essais préliminaires. Plusieurs tests à blanc sont ainsi réalisés avec répétitions afin de fixer avec exactitude la meilleure gamme de doses à utiliser pour les deux plantes examinées, en donnant le maximum d'efficacité dans un

temps très court. En outre, à partir de la dose maximale d'HE et d'extrait, nous avons choisi trois autres doses (Tableau 11).

Tableau 11 : Les doses choisies pour chaque huile essentielle et extrait.

| Plantes | Doses choisies pour les HE ($\mu\text{l/ml}$ d'acétone) | Doses choisies pour les extraits (mg/ml d'acétone) |
|------------------------|--|--|
| <i>Mentha pulegium</i> | D1= 0.25 | D1= 6 |
| | D2= 0.5 | D2= 12 |
| | D3= 1 | D3= 24 |
| | D4= 1.5 | D4= 48 |
| <i>Teucrium polium</i> | D1= 15 | D1= 6 |
| | D2= 30 | D2= 12 |
| | D3= 45 | D3= 24 |
| | D4= 60 | D4= 48 |

1.8.3. Choix du solvant

Pour préparer des solutions d'huile essentielle ou d'extrait avec les doses préalablement citées, on utilise l'acétone comme solvant pour les raisons suivantes :

- Son évaporation très rapide ;
- Absence d'effet résiduel ;
- Son inertie chimique, pas d'interaction avec les composants de l'huile essentielle ou de l'extrait.

Ce solvant est utilisé seulement dans le test par contact, fécondité et fertilité pour permettre une bonne diffusion de l'huile essentielle et de l'extrait dans le papier filtre et le tégument de la graine.

1.8.4. Essais de toxicité des huiles essentielles et des extraits sur *Callosobruchus maculatus*

La toxicité des huiles essentielles sur *C. maculatus* est évaluée par deux modes de pénétration : contact et inhalation. Quant à celle des extraits, elle est évaluée que par effet contact. De plus d'évaluer l'efficacité de ces extraits végétaux (huiles essentielles et extraits

non volatils), on recherche le meilleur mode de pénétration envisagé dans la lutte menée au cours de cette étude expérimentale.

1.8.4.1. Evaluation de la toxicité par contact

L'imprégnation des papiers filtre est la méthode utilisée pour déterminer la toxicité des huiles essentielles et des extraits examinés en mettant directement l'insecte en contact avec ces substances actives.

- Après l'homogénéisation du mélange (solvant + HE ou extrait), on prélève 1 ml de chaque solution et on le répartit uniformément sur un disque de papier filtre de 9 cm de diamètre, placé dans le fond de la boîte de pétri en verre (2 cm de hauteur et 9 cm de diamètre) ;
- Après évaporation totale du solvant, 20 insectes adultes du même âge (0-24 h) et de sexe hétérogène sont déposés dans chaque boîte ;
- Les boîtes sont fermées par de la moustiquaire à maille fine permettant leur aération et empêchant toute fuite d'insectes ;
- Le critère de mortalité retenu correspond à l'absence de mouvements corporels des insectes, même après chatouillement des pattes ;
- Le comptage des insectes est effectué sous une loupe binoculaire après 4, 8, 12, 16 et 24h pour les huiles essentielles et après 12, 24, 48 et 72 h pour les extraits ;
- Trois répétitions et un témoin (l'acétone uniquement) sont réalisés pour chaque dose.

➤ Détermination des DL_{30} , DL_{50} et DL_{90}

Pour estimer l'efficacité des huiles essentielles et des extraits examinés, on a procédé au calcul des DL_{30} , DL_{50} et DL_{90} qui représentent les concentrations de ces substances entraînant la mort de 30, 50 et 90 % des individus, respectivement. Ces doses létales sont calculées à partir des droites de régression dans les courbes de l'évolution proportionnelle des Probits en fonction du log des doses (**Finney**, 1971). Les DL_{30} et DL_{50} serviront à l'évaluation des paramètres de reproduction.

1.8.4.2. Evaluation de la toxicité par inhalation

Dans ce test les doses d'huiles essentielles utilisées sont fixées, mais la lecture de mortalité se prolonge à des temps variables :

- Ce test est utilisé que pour les huiles essentielles (volatiles), pour cela on prépare les doses préalablement choisies (qui seront suffisantes pour saturer une atmosphère de 68.64 cm^3 de volume) ;
- Des demi-bâtonnets de coton-tige de 2 cm de long, fixés contre la face interne du couvercle, seront imbibés de la dose nécessaire d'huile essentielle, le témoin ne subit aucun traitement ;
- Afin de saturer l'ambiance interne, on garde les petits pots cylindriques (68.64 cm^3), contenant les bâtonnets imprégnés d'huile essentielle, fermés pendant 10 min. Après saturation des pots, 20 insectes adultes de même âge et sexe hétérogènes (Figure 19) sont déposés ;
- Le pot est fermé hermétiquement et scotché de l'extérieur pour éviter toute fuite d'odeur ;
- Tous les tests de toxicité ont été réalisés à température ambiante ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) et à une humidité relative de $70 \pm 5\%$;
- Cinq temps de lecture séparés ont été choisis (4, 8, 12, 16 et 24h) à partir du temps maximal d'action de chaque huile essentielle au bout duquel tous les insectes sont morts ;
- Le nombre de répétition est de trois pour les lots traités et les lots témoins.



Figure 19 : Effet de l'inhalation des huiles essentielles sur les insectes.

➤ Temps létaux

Les temps létaux 50 (TL_{50}) et 90 (TL_{90}) représentent les temps au bout desquels on observe une mortalité de 50 et 90% de la population traitée par le toxique à une concentration bien définie. Les TL_{50} et TL_{90} sont fixés à partir des tracés des droites de régressions de l'essai inhalation des huiles essentielles de *Mentha pulegium* (à la dose de $1 \text{ }\mu\text{l}$ correspondant à une dose de $0.014 \text{ }\mu\text{l}/\text{cm}^3$) et de *Teucrium polium* (à la dose de $45 \text{ }\mu\text{l}$ correspondant à une dose de $0.63 \text{ }\mu\text{l}/\text{cm}^3$) à l'égard de *C. maculatus*.

1.8.5. Détermination de l'effet des doses sublétales des huiles essentielles sur la fécondité

La fécondité des femelles exposées aux DL₃₀ et DL₅₀ d'huiles essentielles est déterminée par le nombre d'œufs pondus par la femelle au cours de sa vie. Pour chaque essai, elle est étudiée sur 30 couples d'adultes, âgés de 0-24 heures, répartis dans 03 bocaux en verre, d'une capacité de 250 ml, à raison de 10 couples par bocal.

1.8.5.1. Principe

La quantité de graines de pois chiche réparti par boîte de pétri est de 30 graine avec un poids moyen de 19.7±1 g, par ailleurs, le nombre de répétition est fixé à trois :

- La DL₃₀ ou la DL₅₀ d'huiles essentielles et l'acétone sont mélangés avec les graines de pois chiche dans les bocaux en verre qui restent ouvertes jusqu'à l'évaporation totale du solvant ;
- 10 couples de bruches adultes âgés de 0-24 heures sont introduits dans les bocaux en verre traités ;
- L'observation des pontes est quotidienne et est effectuée à la loupe binoculaire jusqu'à la mort de toutes les femelles (les œufs pondus sont comptés puis éliminés).

1.8.6. Détermination de l'effet des doses sublétales des huiles essentielles sur la fertilité

Pour déterminer la fertilité de l'espèce *Callosobruchus maculatus* (F.), 100 œufs âgés de 0 à 48 heures sont récupérés lors de l'étude de la fécondité. Ces œufs sont répartis à raison de 10 œufs par boîte de pétri en verre contenant 05 graines (chaque graine porte 02 œufs) mises à l'étuve (T de 28±2 °C et HR de 70±5%). Pour chaque essai, 10 répétitions sont réalisées. Le pourcentage d'éclosion est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ éclosion} = \frac{\text{Nombre d'œufs éclos}}{\text{Nombre d'œufs pondus}} \times 100$$

1.8.7. Expression des résultats

La mortalité des insectes est le critère d'efficacité adopté. Cependant dans certains échantillons le nombre d'individus morts ne correspond pas exclusivement à l'effet induit par le traitement. En effet, il existe souvent dans les lots d'insectes traités, une mortalité naturelle

inévitables qui viennent s'ajouter à la mortalité issue de l'intoxication proprement dite de l'insecte. Pour cela, **Abbott** (1925) attribue une formule de correction des pourcentages de mortalités, comme suit :

$$MC (\%) = \frac{(M - Mt) \times 100}{(100 - Mt)}$$

où :

MC : pourcentage de mortalité après correction ;

M : pourcentage de mortalité moyenne d'insectes dans l'échantillon traité ;

Mt : pourcentage de mortalité moyenne d'insectes dans l'échantillon témoin.

L'effet insecticide des huiles essentielles (par contact et inhalation) et des extraits (par contact) est démontré à l'aide de courbes montrant l'évolution des Probits en fonction des variables étudiées (log. Doses et log. Temps).

1.9. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse des données, l'élaboration des graphes et le calcul statistique ont été effectués en utilisant le logiciel **Microsoft Office Excel 2010** et **Statistica 10**. Pour évaluer l'effet antioxydant, antimicrobien et insecticide des huiles essentielles et des extraits testés, il est nécessaire de vérifier si les données obtenues sont homogènes et suivent une loi normale. Cet examen permet alors de choisir le test d'hypothèse le plus approprié. Dans cette étude, le test d'hypothèse de Shapiro-Wilks, qui donne les p-values, a été choisi.

Chapitre II
Résultats
et
discussion

CHAPITRE II

Résultats et discussion

2.1. Optimisation du rendement d'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées par hydrodistillation assistée par ultrasons en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse

Dans le but d'optimiser les conditions d'extraction des huiles essentielles des parties aériennes de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* par hydrodistillation assistée par ultrasons, une étude par méthodologie des surfaces de réponse (MSR) est menée.

Le **Design Expert 10.0.6** (State-Ease, Inc.) est utilisé pour concevoir le plan expérimental de type Box-Behnken qui comprend 17 expériences. Ces expériences sont conduites afin de trouver la combinaison optimale entre les différents facteurs influents sur le procédé d'hydrodistillation assistée par ultrasons (le temps d'extraction, la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau), conduisant au meilleur rendement en huiles essentielles des plantes étudiées.

La MSR nous a permis de déterminer une relation d'approximation entre les variables indépendantes et la réponse. Cette relation est formulée par un polynôme de second degré qui permettra d'optimiser les paramètres du processus afin d'atteindre les rendements souhaitables.

2.1.1. Menthe pouliot

2.1.1.1. Ajustement du modèle

Les 17 expériences réalisées selon le plan de Box-Behnken et le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* obtenu pour chaque essai sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12: Le plan expérimental de Box-Behnken et les valeurs des réponses observées pour l'huile essentielle de la menthe pouliot.

| Essais | Variables non codées | | | Variables codées | | | Rendement d'extraction (%) |
|--------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| | Temps d'extraction (min) | Puissance ultrasonique (W) | Rapport matière végétale/eau (g/ml) | X ₁ | X ₂ | X ₃ | |
| 1 | 60 | 60 | 1 :4 | 0 | 1 | -1 | 2.25 |
| 2 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 2.26 |
| 3 | 90 | 40 | 1 :4 | 1 | 0 | -1 | 2.3 |
| 4 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 2.19 |
| 5 | 60 | 60 | 1 :12 | 0 | 1 | 1 | 2.42 |
| 6 | 90 | 60 | 1 :8 | 1 | 1 | 0 | 2.39 |
| 7 | 30 | 40 | 1 :4 | -1 | 0 | -1 | 1.62 |
| 8 | 30 | 40 | 1 :12 | -1 | 0 | 1 | 1.69 |
| 9 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 2.28 |
| 10 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 2.24 |
| 11 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 2.17 |
| 12 | 60 | 20 | 1 :12 | 0 | -1 | 1 | 2.18 |
| 13 | 90 | 40 | 1 :12 | 1 | 0 | 1 | 2.34 |
| 14 | 90 | 20 | 1 :8 | 1 | -1 | 0 | 2.27 |
| 15 | 60 | 20 | 1 :4 | 0 | -1 | -1 | 2.08 |
| 16 | 30 | 20 | 1 :8 | -1 | -1 | 0 | 1.48 |
| 17 | 30 | 60 | 1 :8 | -1 | 1 | 0 | 1.71 |

Les résultats des différents essais du procédé d'extraction de l'huile essentielle de la menthe pouliot par hydrodistillation assistée par ultrasons sont interprétés par la MSR. Une

analyse de la variance (ANOVA) est effectuée afin d'évaluer le modèle quadratique de surface de réponse qui a été obtenu à partir du plan expérimental de Box-Behnken (Tableau 1, annexe).

Le test de Fisher (valeur de F) qui de 71.12 montre que le modèle est fortement significatif ($p < 0.0001$). La valeur de p avec une très faible probabilité ($p < 0.05$) indique que les termes du modèle sont significatifs. L'analyse statistique révèle que les effets linéaires des trois paramètres du processus (A, B et C) et l'effet quadratique du temps d'extraction (A^2) sont des termes significatifs du modèle. En outre, les résultats de l'analyse des erreurs montrent que le manque d'ajustement n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure ($p > 0.05$). Dans un modèle, si le manque d'ajustement est significative, ce sera rejeté (**Granato et al.**, 2011). Le coefficient de détermination (R^2) obtenu dans cette étude est de 0.9892, ce qui indique que le modèle représente adéquatement les données. Selon **Le Man et al.** (2010), un modèle est adéquat lorsque les valeurs de R^2 sont supérieures à 0.75. Le R^2 ajusté (0.9753) et le R^2 prédit (0.9186) montrent que les valeurs prédites sont très proches des valeurs expérimentales. Le coefficient de variation (C.V.) de 2.18% indique un faible écart entre les valeurs prédites et expérimentales. Les plus petites valeurs de C.V. donnent une meilleure reproductibilité (**Muruganandam et al.**, 2017). La faible valeur de la somme des carrés de l'erreur résiduelle prédite (PRESS), qui est de 0.11, montre que le modèle a un bon ajustement (**Myers et Montgomery**, 2002).

L'équation polynomiale de second ordre représentant le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* en fonction des variables indépendantes est la suivante:

$$Y = + 2.23 + 0.35 * X_1 + 0.095 * X_2 + 0.047 * X_3 - 0.028 * X_1X_2 - 7.500 \times 10^{-3} * X_1X_3 + 0.017 * X_2X_3 - 0.26 * X_1^2 - 0.010 * X_2^2 + 0.015 * X_3^2$$

où Y est le rendement d'extraction prédit exprimé en % ;

X_1 , est le temps d'extraction (min) ;

X_2 est la puissance ultrasonique (W) ;

X_3 est le rapport matière végétale/eau (g/ml) en valeurs codées.

Les coefficients d'estimation indiquent la contribution positive des termes linéaires du temps d'extraction (X_1), de la puissance ultrasonique (X_2) et du rapport matière végétale/eau (X_3), suivi du terme d'interaction entre la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau (X_2X_3) et le terme quadratique du rapport matériel végétal/eau (X_3^2) sur le rendement d'extraction. Ceci montre que le rendement d'extraction augmente avec

l'augmentation des valeurs de ces variables (X_1 , X_2 , X_3 , X_2X_3 et X_3^2). Alors que, les termes quadratiques du temps d'extraction (X_1^2) et de la puissance ultrasonique (X_2^2) et les termes d'interaction entre le temps d'extraction et la puissance ultrasonique (X_1X_2) et entre le temps d'extraction et le rapport matière végétale/eau (X_1X_3) indiquent que l'augmentation de leurs valeurs provoquent une diminution du rendement d'extraction.

2.1.1.2. Analyse des Surfaces de réponse

Les courbes des surfaces de réponse sont tracées afin de trouver le niveau optimal de chaque variable indépendante du processus permettant d'obtenir la réponse maximale (Rajasimman et al., 2009).

Afin de visualiser l'effet combiné des différents paramètres du processus sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle de la menthe pouliot, des courbes de surface de réponse tridimensionnelles (3D) et des tracés de contour bidimensionnels (2D) sont illustrées en maintenant une variable constante à son niveau central et en faisant varier les deux autres dans les limites expérimentales. La Figure 18(a-c) montre les surfaces de réponse 3D et les tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* en fonction de l'interaction entre deux variables indépendantes: le temps d'extraction et la puissance ultrasonique (X_1X_2) avec un rapport matière végétale/eau fixé à 1 :8 g/ml, le temps d'extraction et le rapport matière végétale/eau (X_1X_3) avec une puissance ultrasonique fixée à 40 W et la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau (X_2X_3) avec une durée d'extraction fixée à 60 min.

La forme elliptique du tracé de contour indique la bonne interaction des deux variables, tandis que sa forme circulaire n'indique aucune interaction entre les variables. Les effets d'interaction entre les variables sont significatifs, comme en témoigne la nature elliptique des contours. Selon la Figure 20c, il a été observé que l'augmentation des valeurs du terme interactif de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau permettent d'augmenter la réponse.

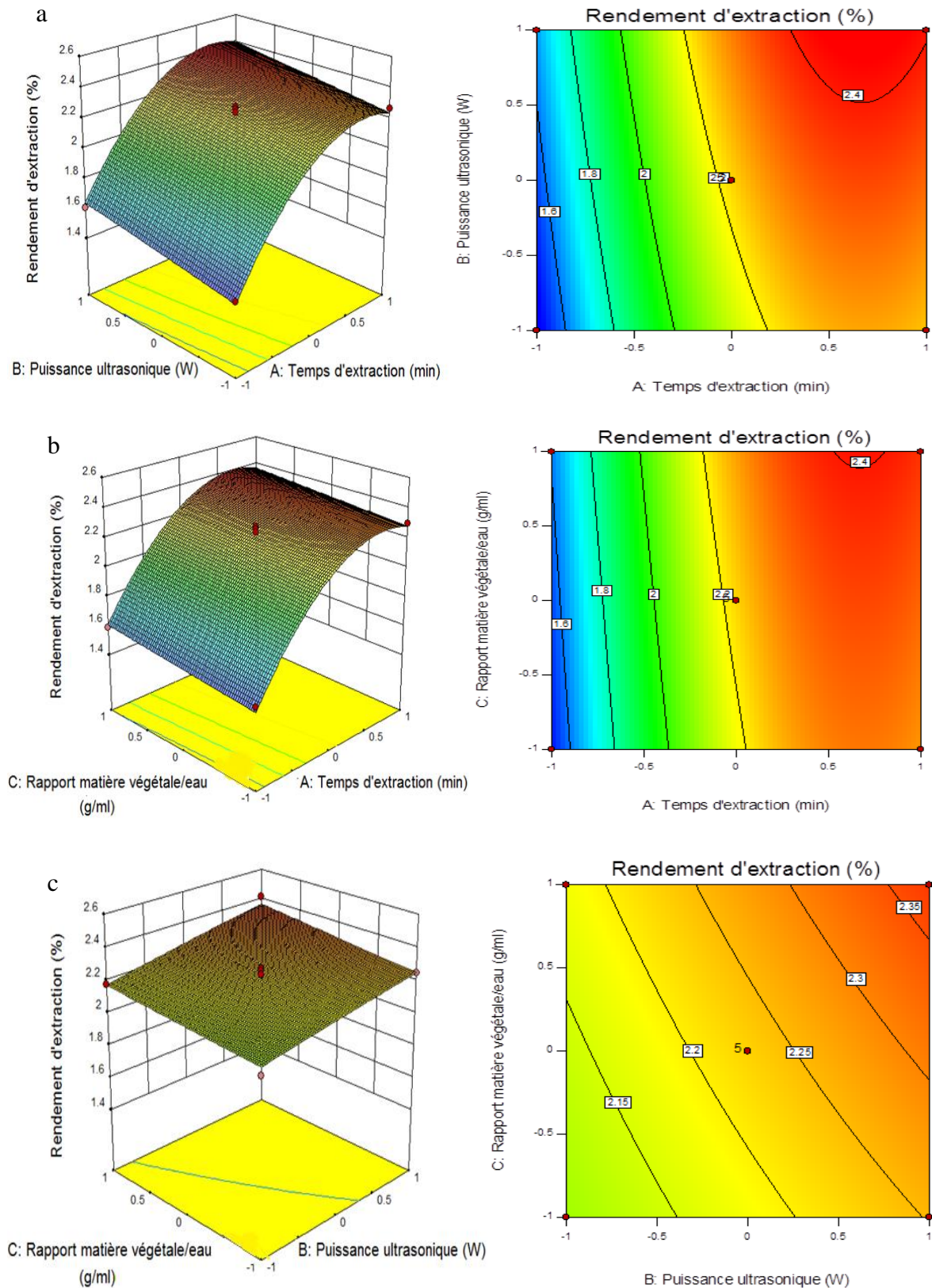


Figure 18 : Surfaces de réponse 3D et tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* en fonction, (a) du temps d'extraction et de la puissance ultrasonique, (b) du temps d'extraction et du rapport matière végétale/eau, (c) de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau.

Afin de minimiser le coût énergétique du procédé d'hydrodistillation assistée par ultrasons, le temps d'extraction est l'un des paramètres les plus importants à optimiser. Nous avons remarqué que le rendement en huile essentielle est influencé par la durée de l'opération d'extraction. L'effet significatif du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle est prouvé par plusieurs auteurs (**Nie et al.**, 2010 ; **Galadima et al.**, 2012 ; **Ranitha et al.**, 2014 ; **Fadil et al.**, 2015 ; **Mainya et al.**, 2016).

Une augmentation du temps d'extraction conduit à un rendement en huile essentielle plus élevé. Cependant, le rendement atteint son maximum lorsque le temps d'extraction atteint sa valeur centrale (Figure 18a et b).

Au-delà de 60 min, la prolongation supplémentaire de la durée d'extraction n'entraîne aucune amélioration significative de la réponse. Cette diminution du rendement d'extraction pourrait être dû à la décomposition chimique des composés bioactifs présents dans les extraits qui peut se produire lors du prolongement du temps d'extraction (**Huang et al.**, 2008). Ces résultats indiquent que l'obtention du rendement désiré nécessite une augmentation du temps d'extraction vers la borne médiane du domaine de variation de ce facteur (60 min).

Les résultats obtenus ont également montré que le rendement en huile essentielle de la menthe pouliot s'améliore avec l'augmentation de la puissance ultrasonique. Cette amélioration peut être attribuée à la génération de plus de bulles responsables du phénomène de cavitation acoustique (**Gholivand et al.**, 2014 ; **Mei et al.**, 2014).

Selon **Chemat et al.**, (2011), une bulle de cavitation peut être générée à proximité de la surface du matériel végétal (Figure 19a), puis pendant un cycle de compression, cette bulle s'effondre (Figure 19b) et un microjet dirigé vers la matrice végétale est créé (Figure 19b et c). La haute pression et la température impliquées dans ce processus vont détruire les parois cellulaires de la matrice du végétal, ce qui facilite la libération de composés extractibles et améliore le transport de masse en perturbant les parois cellulaires du produit et son contenu peut être libéré dans le milieu (Figure 19d).

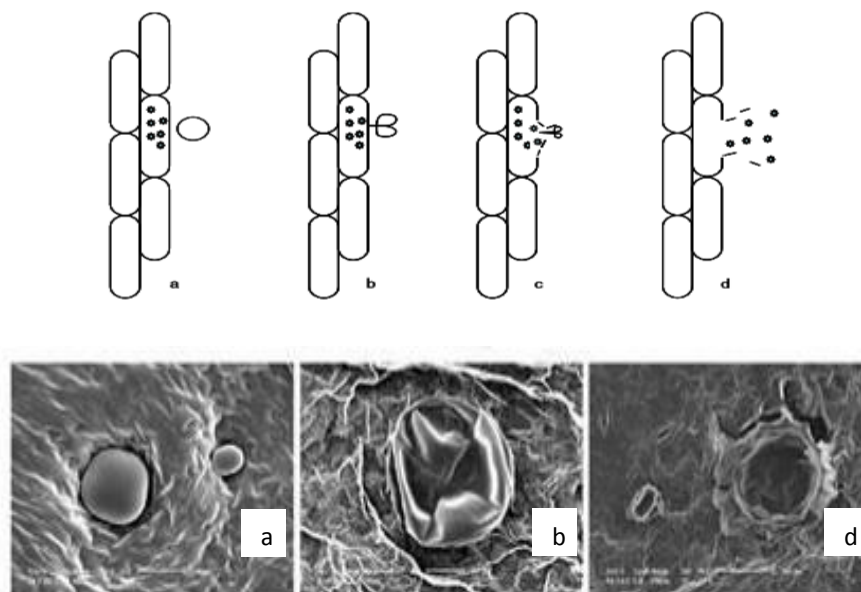


Figure 19 : Formation d'une bulle de cavitation et libération du matériel végétal (**Chemat et al.**, 2011).

Par ailleurs, la Figure 18c montre que le rendement en huile essentielle s'accroît suite à l'augmentation du rapport matière végétale/eau de 1:4 à 1:12 g/ml. Selon **Muruganandam et al.**, (2017), une augmentation du ratio solide/liquide augmente le gradient de concentration et, par conséquent, la vitesse de diffusion des composés et conduit ainsi à une augmentation du rendement d'extraction. En règle générale, un rapport matière végétale/eau plus important permet de dissoudre plus efficacement les composés cibles (**Safaryan et al.**, 2016).

Dans cette étude, l'hydrodistillation assistée par ultrasons s'est avérée être une technique appropriée pour obtenir un rendement d'extraction maximal de l'huile essentielle de la menthe pouliot, tout en réduisant considérablement le temps d'extraction. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs (**Khosravi et al.**, 2013 ; **Morsy**, 2015 ; **Mnayer et al.**, 2017). Selon les résultats de la MSR, les conditions optimales permettant d'obtenir le rendement d'extraction maximal en huile essentielle de *Mentha pulegium* (2.42%) sont une durée d'extraction de 60 min, une puissance ultrasonique de 60 W et un rapport matière végétale/eau de 1:12 g/ml.

2.1.2. Germandrée tomenteuse

2.1.2.1. Ajustement du modèle

Les réponses expérimentales observées en fonction des différentes variables du processus d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium* sont indiquées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Le plan expérimental de Box-Behnken et les valeurs des réponses observées de l'huile essentielle de la germandrée.

| Essais | Variables non codées | | | Variables codées | | | Rendement d'extraction (%) |
|--------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| | Temps d'extraction (min) | Puissance ultrasonique (W) | Rapport matière végétale/eau (g/ml) | X ₁ | X ₂ | X ₃ | |
| 1 | 60 | 60 | 1 :4 | 0 | 1 | -1 | 0.48 |
| 2 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 0.51 |
| 3 | 90 | 40 | 1 :4 | 1 | 0 | -1 | 0.59 |
| 4 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 0.46 |
| 5 | 60 | 60 | 1 :12 | 0 | 1 | 1 | 0.68 |
| 6 | 90 | 60 | 1 :8 | 1 | 1 | 0 | 0.65 |
| 7 | 30 | 40 | 1 :4 | -1 | 0 | -1 | 0.24 |
| 8 | 30 | 40 | 1 :12 | -1 | 0 | 1 | 0.31 |
| 9 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 0.43 |
| 10 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 0.47 |
| 11 | 60 | 40 | 1 :8 | 0 | 0 | 0 | 0.52 |
| 12 | 60 | 20 | 1 :12 | 0 | -1 | 1 | 0.45 |
| 13 | 90 | 40 | 1 :12 | 1 | 0 | 1 | 0.61 |
| 14 | 90 | 20 | 1 :8 | 1 | -1 | 0 | 0.52 |
| 15 | 60 | 20 | 1 :4 | 0 | -1 | -1 | 0.42 |
| 16 | 30 | 20 | 1 :8 | -1 | -1 | 0 | 0.19 |
| 17 | 30 | 60 | 1 :8 | -1 | 1 | 0 | 0.33 |

L'analyse de la variance (ANOVA) permettant l'évaluation des effets linéaires, quadratiques et interactifs de toutes les variables indépendantes du modèle sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium* est présentée dans le Tableau 2, (annexe).

Le test F de Fisher avec une très faible probabilité ($p < 0.0001$) indique une très grande signification du modèle avec un manque d'ajustement insignifiant ($p > 0.05$). Le R^2 obtenu (0.9732) montre que plus de 97% des données expérimentales sont compatibles avec les données prédites par le modèle et qu'uniquement moins de 3% des variations ne sont pas

expliquées par le modèle. Les valeurs élevées de R^2 ajustée (0.9386) et de R^2 prédit (0.8367) ont également plaidé en faveur d'une grande importance du modèle. La faible valeur de C.V. (7.30%) indique que les écarts entre les valeurs expérimentales et prédites sont négligeables. La faible valeur de PRESS (0.049) confirme la validité de ce modèle pour la prédiction de la réponse.

L'expression mathématique de la relation entre le rendement d'extraction prédit de l'huile essentielle de *Teucrium polium* (Y) et les variables indépendantes du processus (X_1 : temps d'extraction, X_2 : puissance ultrasonique, X_3 : rapport matière végétale/eau) est indiquée dans l'équation suivante:

$$Y = + 0.48 + 0.16 * X_1 + 0.070 * X_2 + 0.040 * X_3 - 2.500 \times 10^{-3} * X_1 X_2 - 0.012 * X_1 X_3 + 0.043 * X_2 X_3 - 0.063 * X_1^2 + 7.250 \times 10^{-3} * X_2^2 + 0.022 * X_3^2$$

Selon les résultats des coefficients d'estimations décrits dans le Tableau 15, nous constatons la contribution positive des termes linéaires du temps d'extraction (X_1), de la puissance ultrasonique (X_2) et du rapport matière végétale/eau (X_3) ainsi que celle du terme d'interaction entre la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau ($X_2 X_3$) et ceux des termes quadratiques de la puissance ultrasonique (X_2^2) et du rapport matériel végétal/eau (X_3^2) sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium*. Ces données indiquent que l'augmentation des valeurs des variables X_1 , X_2 , X_3 , $X_2 X_3$, X_2^2 et X_3^2 améliore le rendement d'extraction. Tandis que, le terme quadratique du temps d'extraction (X_1^2) et les termes d'interaction entre le temps d'extraction et la puissance ultrasonique ($X_1 X_2$) et entre le temps d'extraction et le rapport matière végétale/eau ($X_1 X_3$) présentent une contribution négative sur le rendement d'extraction.

2.1.2.2. Analyse des surfaces de réponse

La Figure 20(a-c) présente les surfaces de réponse 3D et les tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium* en fonction de l'effet combiné de deux variables à la fois: le temps d'extraction et la puissance ultrasonique (AB) avec un rapport matière végétale/eau fixé à 1 :8 g/ml, le temps d'extraction et le rapport matière végétale/eau (AC) avec une puissance ultrasonique fixée à 40 W et la puissance ultrasonique et le rapport matière végétale/eau (BC) avec une durée d'extraction fixée à 60 min. Selon la Figure 20c, nous constatons également que le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation des valeurs de BC.

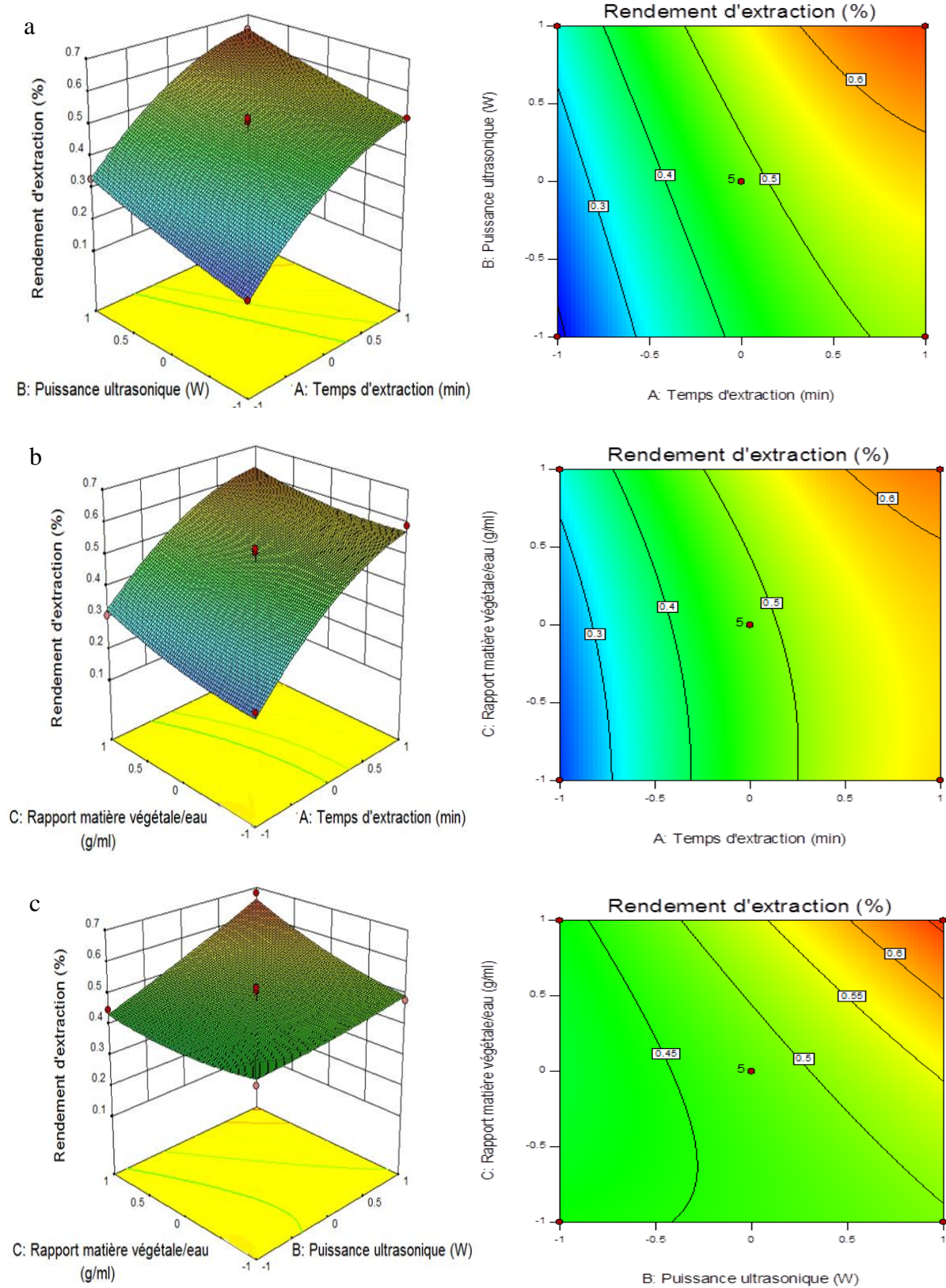


Figure 20 : Surfaces de réponse 3D et tracés de contour 2D du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium* en fonction, (a) du temps d'extraction et de la puissance ultrasonique, (b) du temps d'extraction et du rapport matière végétale/eau, (c) de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau.

Au cours de cette étude, l'utilisation des ultrasons comme prétraitement précédant l'hydrodistillation a permis de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement en huile essentielle de *Teucrium polium*. En effet, les ultrasons perturbent la structure de la paroi cellulaire de la germandrée induisant ainsi la lyse des cellules et accélérant la diffusion des molécules à travers les membranes.

D'après les résultats de la MSR, une durée d'extraction de 60 min, une puissance ultrasonique de 60 W et un rapport matière végétale/eau de 1:12 g/ml sont les conditions optimales permettant la maximisation du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium* vers une valeur de 0.68%.

2.2. Effet du type de solvant sur le rendement d'extraction des plantes étudiées

Le choix du solvant est une étape importante pour l'obtention des extraits avec des rendements acceptables et une forte activité antioxydante (Singh et al., 2014). Le rendement d'extraction dépend du type solvant et sa polarité, du pH, de la température, du temps d'extraction et de la composition chimique et des caractéristiques physiques de l'échantillon (Xu et Chang, 2007 ; Do et al., 2014). Sous le même temps d'extraction et la même température, la nature des solvants utilisés et la composition chimique de l'échantillon sont connus comme étant les paramètres les plus importants (Pavithra et Vadivukkarasi, 2015).

Dans cette étude, les extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sont obtenus en utilisant différents solvants d'extraction (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, chloroforme, hexane et eau). L'influence de ces solvants sur le rendement d'extraction des deux Lamiaceae est indiquée dans le Tableau 14.

Les rendements d'extraction de la menthe pouliot basés sur le poids sec de la plante varient entre 2.53 ± 0.09 et $18.89 \pm 0.56\%$ (g/g) et diminuent dans l'ordre suivant : extrait méthanolique > éthanolique > aqueux > chloroformique > acétate d'éthyle > hexanique. Tandis que pour la germandrée, les rendements d'extraction varient avec des pourcentages allant de 8.47 ± 0.79 à $23.33 \pm 0.61\%$ (g/g) et diminuent comme suit : extrait méthanolique > éthanolique > aqueux > chloroformique > hexanique > acétate d'éthyle. Les résultats décrits dans le Tableau 14 révèlent une variabilité significative des rendements d'extraction de *Menha pulegium* et *Teucrium polium* en fonction du type de solvant utilisé. Les variations des pourcentages des rendements d'extraction sont probablement liées à la polarité des solvants utilisés. Selon

Butsat et **Siriamornpun** (2010), la différence de polarité des solvants d'extraction pourrait influencer la solubilité des constituants chimiques dans un échantillon et son rendement d'extraction. En effet, les solvants polaires (le méthanol, l'éthanol et l'eau) se sont révélés particulièrement efficaces pour atteindre les meilleurs rendements d'extraction des deux plantes étudiées. Cependant, parmi les différents solvants utilisés dans la présente étude, le méthanol a permis d'obtenir le rendement d'extraction le plus élevé pour la menthe pouliot ($18.89 \pm 0.56\%$) ainsi que pour la germandrée ($23.33 \pm 0.61\%$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs, qui ont montré que le méthanol est le solvant le plus approprié pour l'obtention du rendement d'extraction maximal de nombreuses plantes (**Sharififar** et *al.*, 2009 ; **Seddik** et *al.*, 2013 ; **Khorasani Esmaceli** et *al.*, 2015 ; **Zazouli** et *al.*, 2017 ; **Ngo** et *al.*, 2017).

Tableau 14 : Rendements d'extraction (% (g/g)) de la menthe pouliot et de la germandrée.

| Extraits | <i>Mentha pulegium</i> | <i>Teucrium polium</i> |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Méthanolique | 18.89 ± 0.56 | 23.33 ± 0.61 |
| Ethanolique | 17.54 ± 1.13 | 21.97 ± 0.28 |
| Acétate d'éthyle | 6.73 ± 1.02 | 8.47 ± 0.79 |
| Chloroformique | 10.05 ± 0.71 | 10.62 ± 1.15 |
| Hexanique | 2.53 ± 0.09 | 9.80 ± 0.43 |
| Aqueux | 16.22 ± 0.25 | 20.15 ± 0.85 |

2.3. Evaluation de la composition chimique des huiles essentielles

Les composés individuels des huiles essentielles des deux plantes étudiées ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) et temps de rétention (CPG) avec ceux des standards analysés dans les mêmes conditions et stockés dans les bases de données. D'autres identifications ont été faites en comparant les spectres de masse obtenus avec ceux présents dans la bibliothèque de spectres de masse (**NIST**, 2005) et ceux rapportés dans la littérature. Les indices de rétention sont calculés pour tous les constituants de l'huile essentielle en utilisant une série homologue de n-alcanes dans les mêmes conditions opératoires.

2.3.1. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle de la menthe pouliot

Au total, 44 composés sont identifiés dans l'analyse par CPG seule et CG/SM de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation assistée par ultrasons des parties aériennes de la menthe pouliot, représentant 97% de l'ensemble des constituants isolés. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 15 et représentés sur les Figures 21 et 22.

Les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par GC/MS montrent que les composés majoritaires sont l'isomenthone, la pulégone et la menthone avec des taux respectifs de 37.1%, 34.8% et 10.4% (Tableau 15). Les structures chimiques de ces composés sont rapportées à la Figure 23.

En règle générale, ce sont les principaux constituants qui déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles (Djenane et al., 2011). Les études sur la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes.

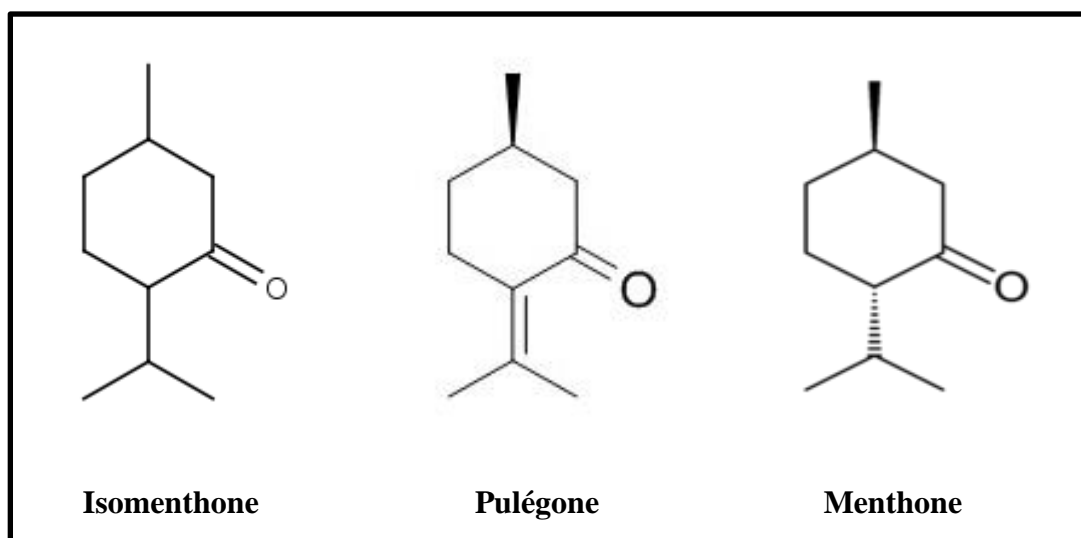


Figure 23: Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

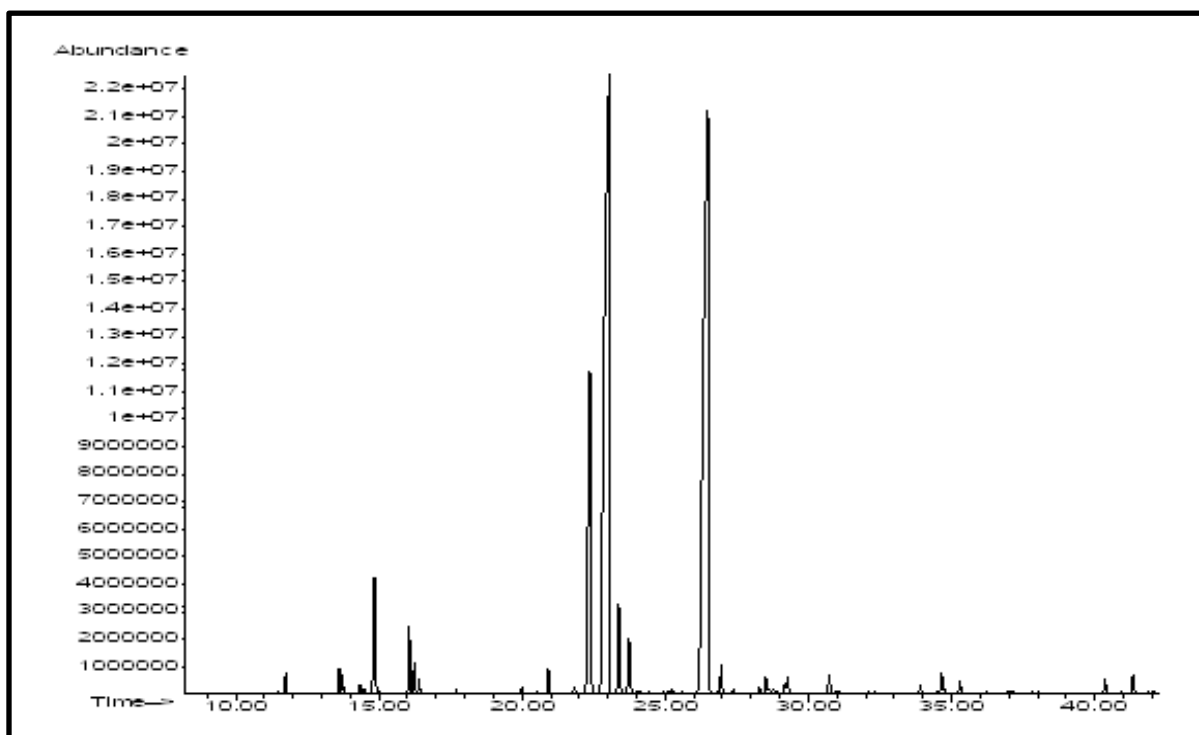


Figure 21 : Chromatogramme total (CG/SM) de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

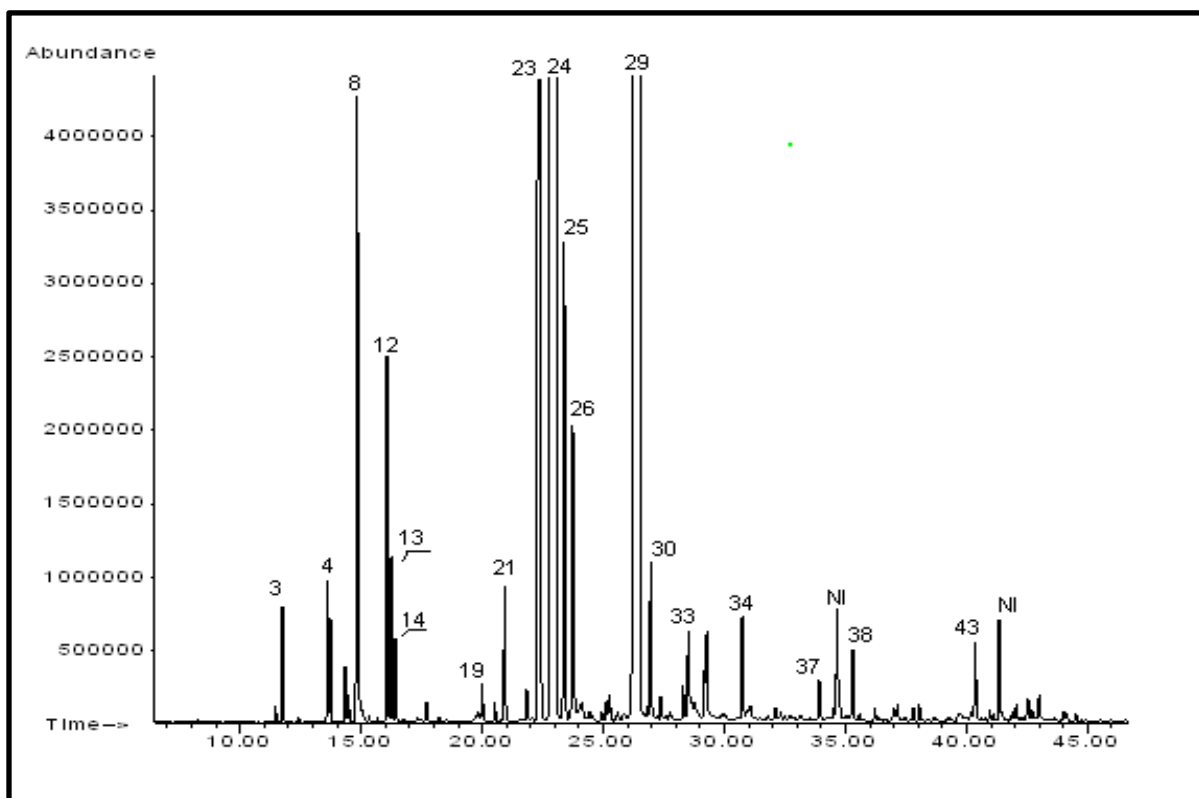


Figure 22 : Chromatogramme agrandi (CG/SM) de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. Les chiffres sur les pics correspondent à ceux des numéros d'ordre des composés indiqués sur le Tableau 17; Ni : Non identifié.

Tableau 15 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle de la menthe pouliot.

| N° | ^a Composés | ^b IR | % | ^c Identification |
|--------------------------------|------------------------|-----------------|-------------|-----------------------------|
| 1 | α -Thujene | 928 | 0.1 | SM-IR |
| 2 | α -Pinene | 937 | 0.4 | SM-IR- Et. |
| 3 | Camphene | 951 | t | SM-IR- Et. |
| 4 | Sabinene | 973 | 0.5 | SM-IR- Et. |
| 5 | β -Pinene | 978 | 0.4 | SM-IR- Et. |
| 6 | 3-Octanone | 985 | 0.2 | SM-IR |
| 7 | β -Myrcene | 990 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 8 | 3-Octanol | 993 | 2.7 | SM-IR |
| 9 | α -Phellandrene | 1004 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 10 | δ -3-Carene | 1011 | t | SM-IR- Et. |
| 11 | α -Terpinene | 1017 | t | SM-IR- Et. |
| 12 | p-Cymene | 1024 | 1.3 | SM-IR- Et. |
| 13 | Limonene | 1030 | 0.6 | SM-IR- Et. |
| 14 | 1,8-Cineole | 1032 | 0.3 | SM-IR- Et. |
| 15 | cis- β -Ocimene | 1038 | t | SM-IR |
| 16 | γ -Terpinene | 1060 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 17 | cis-Sabinene hydrate | 1067 | t | SM-IR |
| 18 | Filifolone | 1097 | t | SM-IR |
| 19 | α -Thujone | 1105 | 0.2 | SM-IR |
| 20 | β -Thujone | 1115 | 0.1 | SM-IR |
| 21 | 3-Octanol acetate | 1116 | 0.5 | SM-IR |
| 22 | Camphor | 1144 | 0.2 | SM-IR- Et. |
| 23 | Menthone | 1151 | 10.4 | SM-IR- Et. |
| 24 | Isomenthone | 1159 | 37.1 | SM-IR |
| 25 | Isopulegone | 1165 | 1.9 | SM-IR |
| 26 | neo-Menthol | 1167 | 1.5 | SM-IR |
| 27 | α -Terpineol | 1190 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 28 | Carveol | 1217 | 0.1 | SM-IR |
| 29 | Pulegone | 1235 | 34.8 | SM-IR |
| 30 | Piperitone | 1254 | 0.6 | SM-IR |
| 31 | Bornyl acetate | 1284 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 32 | Thymol | 1290 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 33 | Carvacrol | 1300 | 0.5 | SM-IR- Et. |
| 34 | Piperitenone | 1341 | 0.5 | SM-IR |
| 35 | α -Copaene | 1376 | 0.1 | SM-IR |
| 36 | β -Boubonene | 1384 | t | SM-IR |
| 37 | β -Caryophyllene | 1420 | 0.2 | SM-IR |
| 38 | α -Humulene | 1443 | 0.3 | SM-IR |
| 39 | γ -Muurolene | 1476 | 0.1 | SM-IR |
| 40 | α -Muurolene | 1498 | 0.1 | SM-IR |
| 41 | γ -Cadinene | 1513 | 0.1 | SM-IR |
| 42 | δ -Cadinene | 1523 | 0.1 | SM-IR |
| 43 | Caryophyllene oxide | 1581 | 0.4 | SM-IR |
| 44 | α -Cadinol, epi | 1638 | 0.1 | SM-IR |
| Composés identifiés (%) | | | 97.0 | |

| | |
|-------------------------------------|------|
| Monoterpènes hydrocarbonés | 3.6 |
| Monoterpènes oxygénés | 89.0 |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | 1.0 |
| Sesquiterpènes oxygénés | 0.5 |
| Autres | 2.9 |

^a composés classés par ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5 MS ;

^b Indices de rétention par rapport à la série d'alcane normaux C₈-C₂₂ ;

^c Identification ; SM : par comparaison des spectres de masse à ceux de la bibliothèque de spectres de masse (NIST 2005) ; Et. : par comparaison des indices de rétention à ceux des standards analysés dans les mêmes conditions opératoires ; t : Trace (< 0.05 %).

Les différentes classes chimiques composant l'huile essentielle de la menthe pouliot sont représentées sur la Figure 24. L'analyse de la composition chimique montre que cette essence est principalement dominée par les monoterpènes oxygénés (89%) et plus particulièrement par les cétones qui constituent le groupe le plus abondant avec un taux de 86.3% de la composition globale de l'huile (l'isomenthone, la pulégone, la menthone, l'isopulégone et la pipéritone,...). Nous notons également la présence en faibles proportions des monoterpènes hydrocarbonés (3.6%), des sesquiterpènes hydrocarbonés (1%) et des sesquiterpènes oxygénés (0.5%).

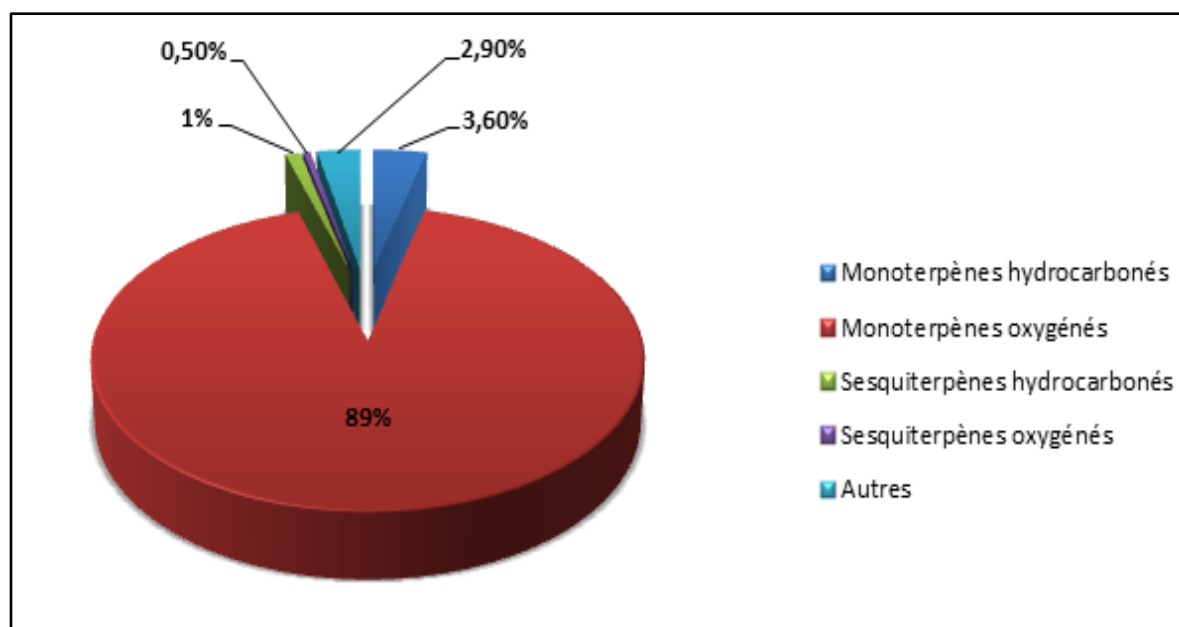


Figure 24 : Répartition en pourcentage des différentes classes chimiques composant l'huile essentielle de la menthe pouliot.

Des travaux antérieurs à la présente étude ont porté sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et révèlent l'existence de plusieurs chémotypes (Tableau 3, annexe). La pulégone est rapporté comme constituant majoritaire des

huiles essentielles de *Mentha pulegium* de Corse (**Sutour**, 2010), de Maroc (**Ait-Ouazzou et al.**, 2012), d'Italie (**Caboni et al.**, 2013) et de Portugal (**Rodrigues et al.**, 2013). D'autres composés sont mentionnés comme majoritaires dans l'huile essentielle de la menthe pouliot comme la menthone (**Ghazghazi et al.**, 2013), la pipériténone (**Foganholi et al.**, 2015) et l'oxyde de pipériténone (**Sevindik et al.**, 2017). En Algérie, plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence la composition chimique de l'huile essentielle de la menthe pouliot et ont tous abouti à la révélation d'un chémotype à pulégone. **Boukhebt** et al., (2011) ont étudié l'huile essentielle de la menthe pouliot de la région de Sétif dont la composition chimique est dominée par la pulégone (38.8%), la menthone (19.3%), la pipériténone (16.5%) et la pipéritone (6.3 %). **Abdelli et al.**, (2016) ont montré que la pulégone (70.66 %), le néo-menthol (11.21%), la menthone (2.63 %) et la cis-isopulégone (2.33 %) sont les principaux constituants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de la région de Bouira. Selon l'étude menée par **Yahiaoui et al.**, (2017), le principal constituant de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Bejaia est la pulégone (88.78%).

D'après les résultats obtenus dans notre étude, nous pouvons déduire que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* analysée appartient au chémotype isomenthone / pulégone / menthone. Notons, par ailleurs, que l'huile essentielle de la menthe pouliot présente un profil chimique spécifique. En effet, la présence de la pulégone dans cette essence ne constitue pas une originalité, mais l'association de ce constituant avec à la fois, l'isomenthone et la menthone dans une huile essentielle de *Mentha pulegium* avec les proportions mentionnées précédemment n'a jamais été décrite dans la littérature.

Les variations de la composition chimique de l'huile essentielle étudiée, du point de vue qualitatif et quantitatif, sont probablement dues aux conditions climatiques (rayonnement solaire, rayonnement UV, précipitations et température moyenne) et édaphiques ainsi qu'à la méthode d'extraction et le mode de conservation (**Castelo et al.**, 2012 ; **Turek et Stintzing**, 2013 ; **Soro et al.**, 2015). Ces variations peuvent également être influencées par les conditions de culture des plantes, la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même par des facteurs génétiques (**Senatore**, 1996 ; **Kokkini et al.**, 1997 ; **Russo et al.**, 1998 ; **Thompson et al.**, 2003 ; **Karousou et al.**, 2005 ; **Ehsani et al.**, 2017). Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent la proportion relative des composés principaux caractéristiques. Cela conduit à l'existence de différents chémotypes qui distinguent les huiles essentielles de différentes origines (**Djenane et al.**, 2011).

2.3.2. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle de la germandrée tomenteuse

Les résultats des analyses chromatographiques (CPG et CG/SM) de l'huile essentielle extraite à partir des parties aériennes de la germandrée ont permis l'identification et la quantification de 74 composés, correspondant à 91.3 % de la composition chimique totale de l'huile. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 16 et représentés sur la Figure 25.

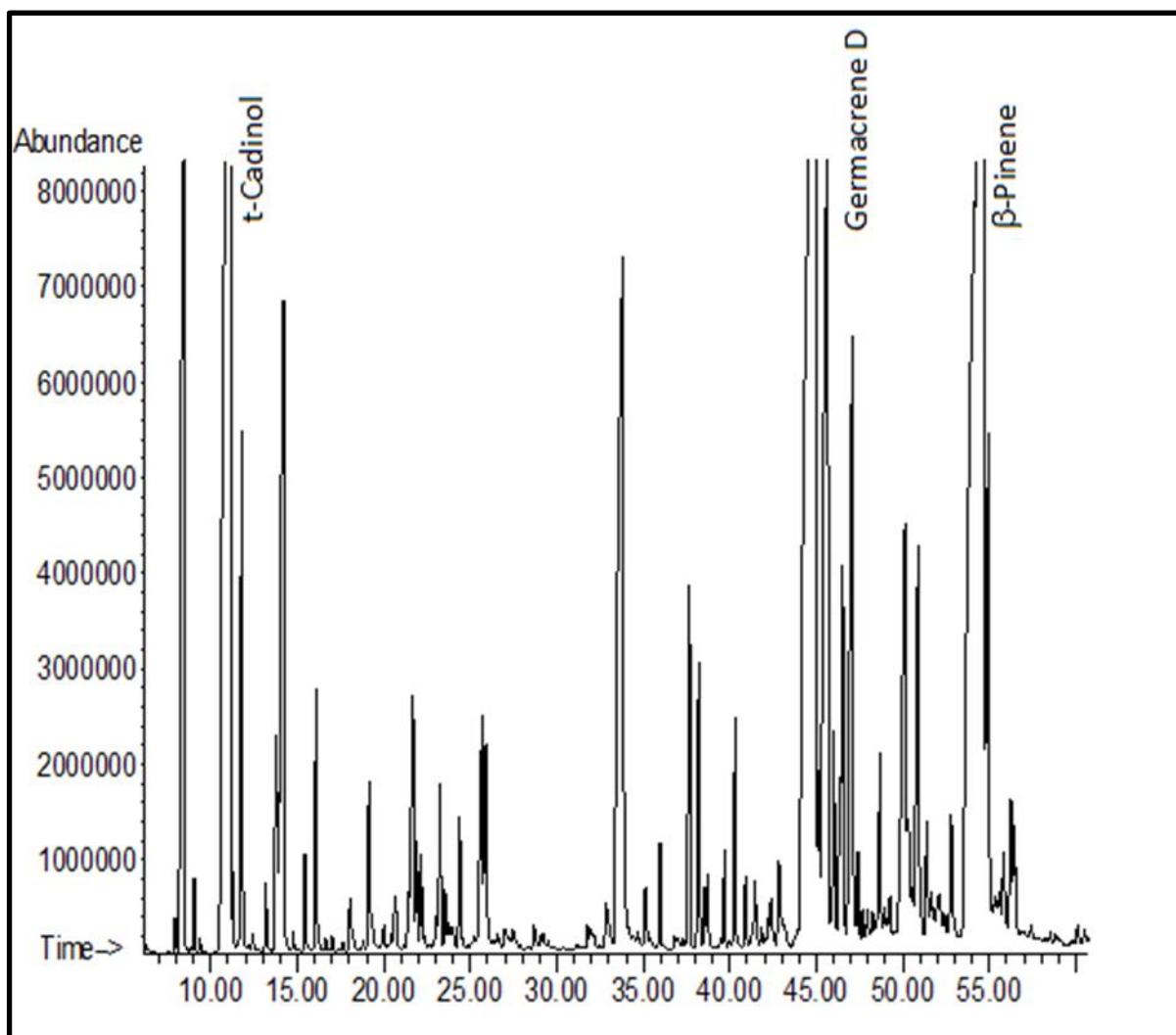


Figure 25 : Chromatogramme (CG/SM) de l'huile essentielle de *Teucrium polium*.

Tableau 16 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle de la germandrée.

| N° | ^a Composés | ^b IR | % | ^c Identification |
|----|---|-----------------|------------|-----------------------------|
| 1 | α -Thujene | 925 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 2 | α -Pinene | 935 | 3.9 | SM-IR- Et. |
| 3 | Camphene | 948 | 0.2 | SM-IR- Et. |
| 4 | β-Pinene | 976 | 9.7 | SM-IR- Et. |
| 5 | 1-Octan-3-ol | 986 | 0.2 | SM-IR |
| 6 | β -Myrcene | 992 | 1.3 | SM-IR |
| 7 | α -Phellandrene | 1005 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 8 | α -Terpinene | 1017 | 0.2 | SM-IR- Et. |
| 9 | p-Cymene | 1026 | 0.6 | SM-IR |
| 10 | Limonene | 1029 | 3.5 | SM-IR- Et. |
| 11 | 1,8-Cineole | 1033 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 12 | cis- β -Ocimene | 1042 | 0.1 | SM-IR |
| 13 | trans- β -Ocimene | 1048 | 0.2 | SM-IR |
| 14 | γ -Terpinene | 1061 | 0.4 | SM-IR- Et. |
| 15 | Terpinolene | 1087 | 0.2 | SM-IR- Et. |
| 16 | Linalool | 1104 | 0.7 | SM-IR- Et. |
| 17 | β -Thujone | 1105 | 0.1 | SM-IR |
| 18 | cis- p-2-menthen-1-ol | 1107 | 0.1 | SM-IR |
| 19 | Chrysanthenone | 1110 | 0.1 | SM-IR |
| 20 | Campholaldehyde | 1113 | 0.2 | SM-IR |
| 21 | 4-Acetyl-1-methylcyclohexane | 1117 | 0.2 | SM-IR |
| 22 | β -Pinone (nopinone) | 1119 | 0.1 | SM-IR |
| 23 | trans-Pinocarveol | 1126 | 0.6 | SM-IR |
| 24 | Camphor | 1144 | 0.4 | SM-IR- Et. |
| 25 | Verbenol | 1146 | 0.3 | SM-IR |
| 26 | p-Menth-4(8)-ene | 1158 | 0.1 | SM-IR |
| 27 | Pinocarvone | 1062 | 0.7 | SM-IR |
| 28 | Borneol | 1067 | 0.2 | SM-IR |
| 29 | Pinocamphone | 1172 | 0.1 | SM-IR |
| 30 | 4-Terpineol | 1177 | 0.3 | SM-IR- Et. |
| 31 | p-Cymen-8-ol | 1187 | 0.1 | SM-IR |
| 32 | α -Terpineol | 1194 | 0.2 | SM-IR- Et. |
| 33 | Myrtenal | 1196 | 1.2 | SM-IR |
| 34 | Myrtenol | 1198 | 0.6 | SM-IR |
| 35 | Verbenone | 1203 | 0.1 | SM-IR |
| 36 | trans-Carveol | 1205 | 0.1 | SM-IR |
| 37 | Cuminaldehyde | 1215 | 0.1 | SM-IR |
| 38 | Carvone | 1218 | 0.1 | SM-IR |
| 39 | Bornyl acetate | 1285 | 0.1 | SM-IR- Et. |
| 40 | α -Fenchyl acetate | 1293 | 0.1 | SM-IR |
| 41 | Thymol | 1302 | 0.4 | SM-IR- Et. |
| 42 | Carvacrol | 1318 | 6.1 | SM-IR- Et. |
| 43 | 1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene | 1337 | 0.2 | SM-IR |
| 44 | α -Cubebene | 1348 | 0.2 | SM-IR |

| | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------|-------------|-------|
| 45 | Eugenol | 1353 | 0.1 | SM-IR |
| 46 | α -copaene | 1372 | 0.8 | SM-IR |
| 47 | β -Boubonene | 1380 | 1.1 | SM-IR |
| 48 | β -Cubebene | 1390 | 0.2 | SM-IR |
| 49 | β -Elemene | 1394 | 0.2 | SM-IR |
| 50 | α -Gurjunene | 1403 | 0.2 | SM-IR |
| 51 | β -Caryophyllene | 1415 | 0.4 | SM-IR |
| 52 | β -Gurjunene | 1432 | 0.2 | SM-IR |
| 53 | α -Bergamotene | 1434 | 0.2 | SM-IR |
| 54 | α -Amorphene | 1441 | 0.1 | SM-IR |
| 55 | α -Humulene | 1452 | 0.2 | SM-IR |
| 56 | Allo-aromadendrene | 1457 | 0.2 | SM-IR |
| 57 | Germacrene D | 1477 | 16.1 | SM-IR |
| 58 | Bicyclosesquiphellandrene | 1488 | 0.3 | SM-IR |
| 59 | Bicyclogermacrene | 1492 | 4.9 | SM-IR |
| 60 | γ -Cadinene | 1511 | 1.8 | SM-IR |
| 61 | δ -Cadinene | 1518 | 2.6 | SM-IR |
| 62 | Cardina-1,4-diene | 1527 | 0.3 | SM-IR |
| 63 | α -Cardinene | 1529 | 0.1 | SM-IR |
| 64 | Germacrene B | 1558 | 0.8 | SM-IR |
| 65 | Germacrene D-4-ol | 1568 | 0.2 | SM-IR |
| 66 | Spathulenol | 1570 | 2.6 | SM-IR |
| 67 | Globulol | 1574 | 0.3 | SM-IR |
| 68 | Viridiflorol | 1587 | 2.1 | SM-IR |
| 69 | Caryophylladienol | 1628 | 0.2 | SM-IR |
| 70 | t-Cadinol | 1639 | 17.9 | SM-IR |
| 71 | α -cadinol | 1650 | 2.2 | SM-IR |
| 72 | Nootkatone | 1774 | 0.1 | SM-IR |
| 73 | Hexahydrofarnesyl acetone | 1849 | 0.2 | SM-IR |
| 74 | Hexadecanoic acid (palmitic acid) | 1982 | 0.1 | SM-IR |
| Composés identifiés (%) | | | 91.3 | |
| Monoterpènes hydrocarbonés | | | 21.4 | |
| Monoterpènes oxygénés | | | 12.8 | |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | | | 30.3 | |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | 25.8 | |
| Autres | | | 1.0 | |

^a composés classés par ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5 MS ;

^b Indices de rétention par rapport à la série d'alcane normaux C₈-C₂₂ ;

^c Identification ; SM : par comparaison des spectres de masse à ceux de la bibliothèque de spectres de masse (NIST 2005) ; Et. : par comparaison des indices de rétention à ceux des standards analysés dans les mêmes conditions opératoires ; t : Trace (< 0.05 %).

L'analyse de l'huile essentielle de la germandrée par CG/SM montre que cette dernière est largement dominée par les sesquiterpènes hydrocarbonés (30.3%) et les sesquiterpènes

oxygénés (25.8%), ainsi que par les monoterpènes hydrocarbonés (21.4%). Toutefois, les monoterpènes oxygénés (12.8%) constituent la plus faible proportion (Figure 26).

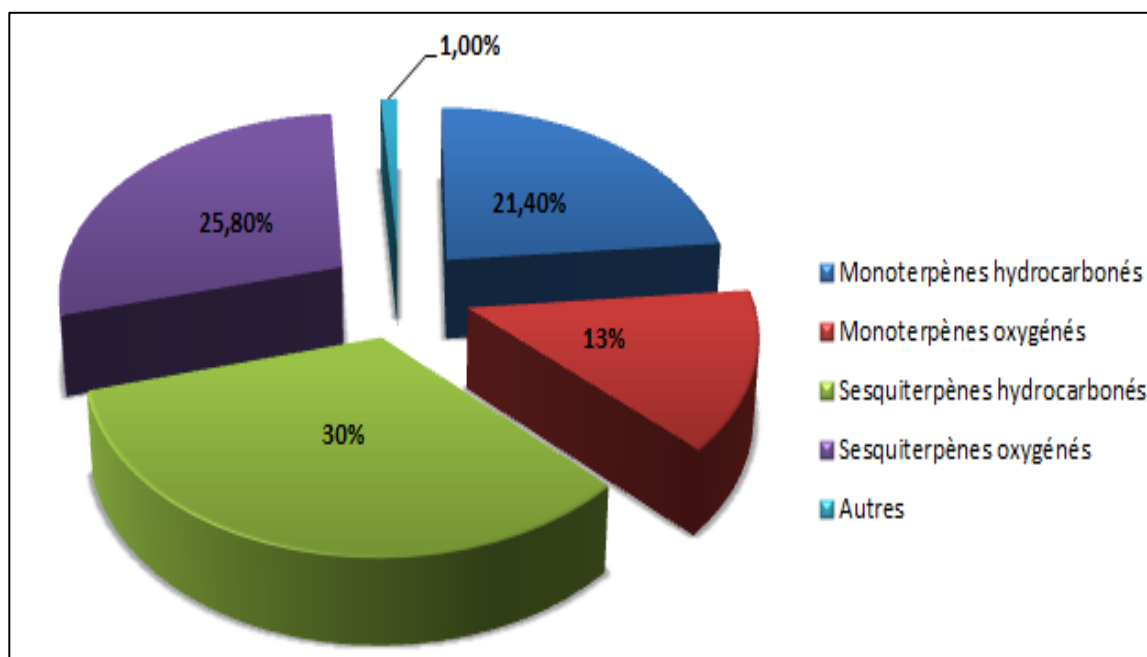


Figure 26 : Répartition en pourcentage des différentes classes chimiques composant l'huile essentielle de la germandrée.

La composition chimique de *Teucrium polium* est marquée par la présence du t-cadinol (17.9%), de la germacrène D (16.1%) et de la β -pinène (9.7%) comme composés majoritaires (Figure 27).

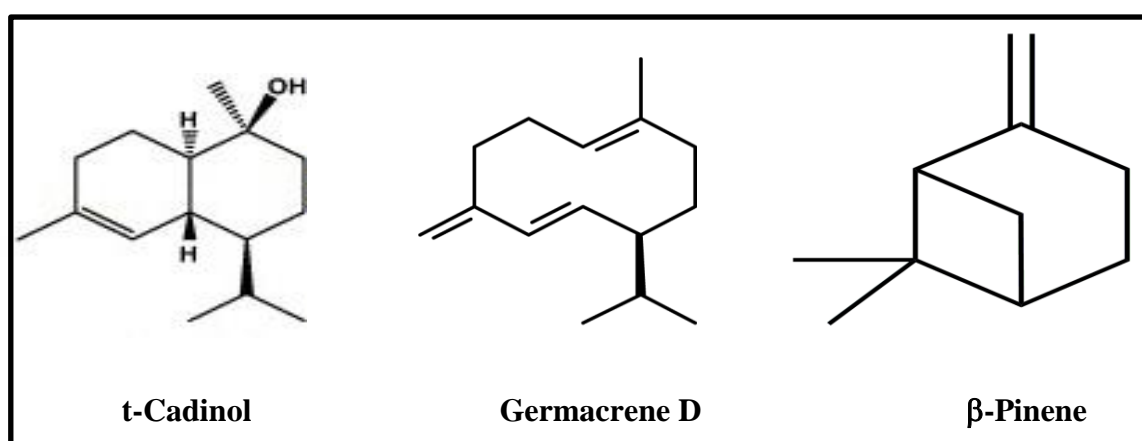


Figure 27 : Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Teucrium polium*.

L'étude comparative des résultats obtenus sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* et ceux de la littérature a montré de forte variation en fonction

de l'origine géographique de l'espèce (Tableau 4, annexe). Selon l'étude menée par **Bakari et al.**, (2015), l' α -pinène (17.04%), la β -pinène (12.68%), le limonène (6.65%), le β -myrcène (6.07%) et la germacrène D (5.89%) sont les principaux constituants de l'huile essentielle de *Teucrium polium* de Tunisie. Les composés majoritaires de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de la germandrée d'Iran sont l' α -pinène (18.2%), l'élémol (14.5%), la β -pinène (10.01%), le cubénol (10.0%) et le limonène (6.98 %) (**Sabzghabaie et Asgarpanah**, 2016). L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* de Turquie révèle que la germacrène D (8.10 %), le carvacrol (5.41%), la β -pinène (4.63%), l' α -copaène (3.40%) et le spathuléol (3.32%) sont les composés majoritaires (**Kurtoğlu et Tğn**, 2017). **Asgharipour et Shabankare**, (2017) ont rapporté que l'huile essentielle de la germandrée d'Iran est constituée de la β -caryophyllène (12.80- 28.40%), de la farnésène-cis-b (5.60- 18.4%), de la germacrène D (2.10-13.40%), du bicyclogermacrène (3.40- 12.00 %), du linalool (1.80-15.65 %) et du carvacrol (1.70- 8.60 %). En Algérie, nous notons une grande variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de la germandrée d'une région à une autre. L'étude menée par **Kabouche et al.**, (2007) a révélé que l'huile essentielle de *Teucrium polium* d'Ain Mlila est constituée d' α -cadinol (46.8%), de 3β -hydroxy- α -muurolène (22.5%), d' α -pinène (9.5 %) et de β -pinène (8.3 %). **Hammoudi et al.**, (2013) ont montré que l'huile essentielle de la germandrée de Tamanrasset est principalement composée de limonène (11.2%), de β -caryophyllène (9.2%) et de γ -cadinène (10.2%). L'étude visant à déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* de Tlemcen a rapporté que la germacrène D (25.81 %), le bicyclogermacrène (13%), la β -pinène (11.69%) et le carvacrol (8.93 %) sont les composés majoritaires (**Belmekki et al.**, 2013). Selon **Lograda et al.**, (2014), les principaux constituants de l'huile essentielle de la germandrée provenant de la région de Sétif sont l' α -pinène (14.1-18%), la β -pinène (15-18.1%), la germacrène D (3.8-19%), le myrcène (8.2-10.4%) et le limonène (5.3 -8.7%).

2.4. Teneur en polyphénols des extraits obtenus par les différents solvants

Les composés phénoliques ou polyphénols sont très importants en raison de leurs activités antioxydantes qui sont dues à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (**Nijveldt et al.**, 2001). Les flavonoïdes sont le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres et agissent comme des antioxydants efficaces (**Fraga**, 2010).

L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les différents extraits examinés de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* est réalisée respectivement par les méthodes spectrophotométriques de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). La quantité des polyphénols totaux est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentrations (Figure 1, annexe). La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait). Le contenu en flavonoïdes totaux est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine à différentes concentrations (Figure 2, annexe). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

➤ Cas de la menthe pouliot

La quantité de polyphénols et de flavonoïdes totaux présente dans les différents extraits de la menthe pouliot (méthanolique, éthanolique, acétate d'éthyle, chloroformique, hexanique et aqueux) est indiquée dans le Tableau 17. La teneur en polyphénols totaux des différents extraits testés varie significativement en fonction du type de solvant utilisé, avec des proportions allant de 94.07 ± 2.34 à 197.86 ± 2.54 mg d'EAG/g d'extrait. La comparaison de cette teneur entre les différents extraits de *Mentha pulegium* nous a permis d'établir cet ordre : l'extrait méthanolique > aqueux > éthanolique > acétate d'éthyle > chloroformique > hexanique.

Par ailleurs, la teneur en flavonoïdes totaux des extraits de la menthe pouliot testés est comprise entre 29.32 ± 1.46 et 86.20 ± 2.09 mg de EQ/g d'extrait et diminue dans l'ordre suivant: l'extrait aqueux > méthanolique > acétate d'éthyle > chloroformique > hexanique > éthanolique. Nos résultats indiquent que l'extrait méthanolique présente la plus grande quantité de phénols totaux avec une valeur de 197.86 ± 2.54 mg d'EAG/g d'extrait, tandis que, l'extrait aqueux montre la teneur en flavonoïdes totaux la plus élevée avec une valeur de 86.20 ± 2.09 mg de EQ/g d'extrait.

Les résultats décrits dans le Tableau 17 révèlent une variabilité des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les différents extraits examinés de *Mentha pulegium*. Cette variabilité pourrait être expliquée par la différence de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction (Stankovic et al., 2012). La solubilité des polyphénols dépend du type de solvant utilisé dans leur extraction et de sa polarité (Allothman et al., 2009). D'autre part, Iloki-Assanga et al., (2015) ont observé que les composés phénoliques sont souvent extraits en plus grande quantité dans les solvants les plus polaires et que leur solubilité est

principalement affectée par la présence et la position des groupes hydroxyles ainsi que de la taille moléculaire et de la longueur des chaînes hydrocarbonées constitutives. De plus, **Addai et al.**, (2013) ont rapportés qu'une augmentation de la polarité des solvants conduit à une amélioration de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans l'extrait.

Tableau 17 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Mentha pulegium*.

| Extraits | Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait) | Flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait) |
|-------------------------|--|---|
| Méthanolique | 197.86±2.54 | 71.92±1.23 |
| Ethanolique | 113.45±2.72 | 29.32±1.46 |
| Acétate d'éthyle | 128.69±2.13 | 62.23±0.78 |
| Chloroformique | 104.34±1.26 | 49.38±0.61 |
| Hexanique | 94.07±2.34 | 30.38±1.54 |
| Aqueux | 176.30±1.42 | 86.20±2.09 |

➤ Cas de la germandrée tomenteuse

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux présentes dans les différents extraits de *Teucrium polium* sont consignées dans le Tableau 18. La quantité des polyphénols totaux des différents extraits testés est comprise entre 83.7±0.15 et 206.95±1.82 mg d'EAG/g d'extrait et diminue dans l'ordre suivant : l'extrait méthanolique > aqueux > éthanolique > acétate d'éthyle > chloroformique > hexanique. Alors que, la teneur en flavonoïdes totaux varie entre 5.74±0.19 et 42.16±0.61 mg d'EQ/g d'extrait et diminue dans cet ordre : l'extrait méthanolique > aqueux > éthanolique > hexanique > chloroformique > acétate d'éthyle.

Les résultats indiqués dans le Tableau 18 montrent que l'extrait méthanolique contient la plus grande quantité de polyphénols et de flavonoïdes totaux avec des valeurs respectives de 206.95±1.82 mg d'EAG/g d'extrait et 42.16±0.61 mg d'EQ/g d'extrait. Par conséquent, parmi les six solvants testés dans notre étude, le méthanol s'est avéré être le solvant le plus approprié

pour l'extraction de la teneur la plus élevée en composés phénoliques à partir des parties aériennes de *Teucrium polium*. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études, qui ont révélé que le méthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques des plantes (Stankovic et al., 2012 ; Ali et al., 2014 ; Khorasani Esmaceli et al., 2015 ; Padalia et al., 2017 ; Nabi et Shrivastava, 2017 ; Dhawan et Gupta, 2017).

Tableau 18 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Teucrium polium*.

| Extraits | Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait) | Flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait) |
|-------------------------|--|---|
| Méthanolique | 206.95±1.82 | 42.16±0.61 |
| Ethanolique | 157.42±4.12 | 34.46±2.24 |
| Acétate d'éthyle | 113.23±3.54 | 5.74±0.19 |
| Chloroformique | 102.36±2.83 | 12.83±1.92 |
| Hexanique | 83.7±0.15 | 23.65±0.60 |
| Aqueux | 184.84±2.25 | 38.95±1.13 |

2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits étudiés

Il n'existe aucune méthode unique qui est capable d'évaluer pleinement la capacité antioxydante totale ou de donner une prédiction complète de l'efficacité antioxydante des différents composés, puisque les antioxydants peuvent agir par différents mécanismes (De Marino et al., 2012). Ainsi, trois méthodes spectrophotométriques différentes (le test de piégeage du DPPH, le test de piégeage de l'ABTS et la mesure du pouvoir réducteur) sont utilisées pour évaluer in vitro l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits des deux plantes étudiées. Le BHT et le Trolox sont utilisés comme standards de référence.

2.5.1. Activité de piégeage du radical 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité de piégeage du radical DPPH est la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer l'activité antioxydante à la fois des composés purs et des échantillons complexes. Dans ce test, le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) de couleur violette est réduit par les composés antioxydants présents dans les huiles essentielles et les extraits testés en diphénylpicrylhydrazine (DPPH-H) de couleur jaune. Cette procédure implique la mesure de la diminution de l'absorbance du radical DPPH à 517 nm, qui est proportionnelle à la concentration des substances anti-radicalaires ajoutée à la solution du réactif DPPH (Boligon et al., 2014). L'effet des antioxydants sur le piégeage du radical DPPH est généralement attribué à leur capacité à donner de l'hydrogène (Ashokkumar et al., 2008 ; Biswas et al., 2010).

2.5.1.1. Cas des huiles essentielles

Les résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH sont représentés sur la Figure 28. Les activités anti-radicalaires obtenues révèlent que les huiles essentielles étudiées possèdent un profil dose-dépendant contre le radical DPPH. En effet, l'activité de piégeage du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de ces huiles essentielles.

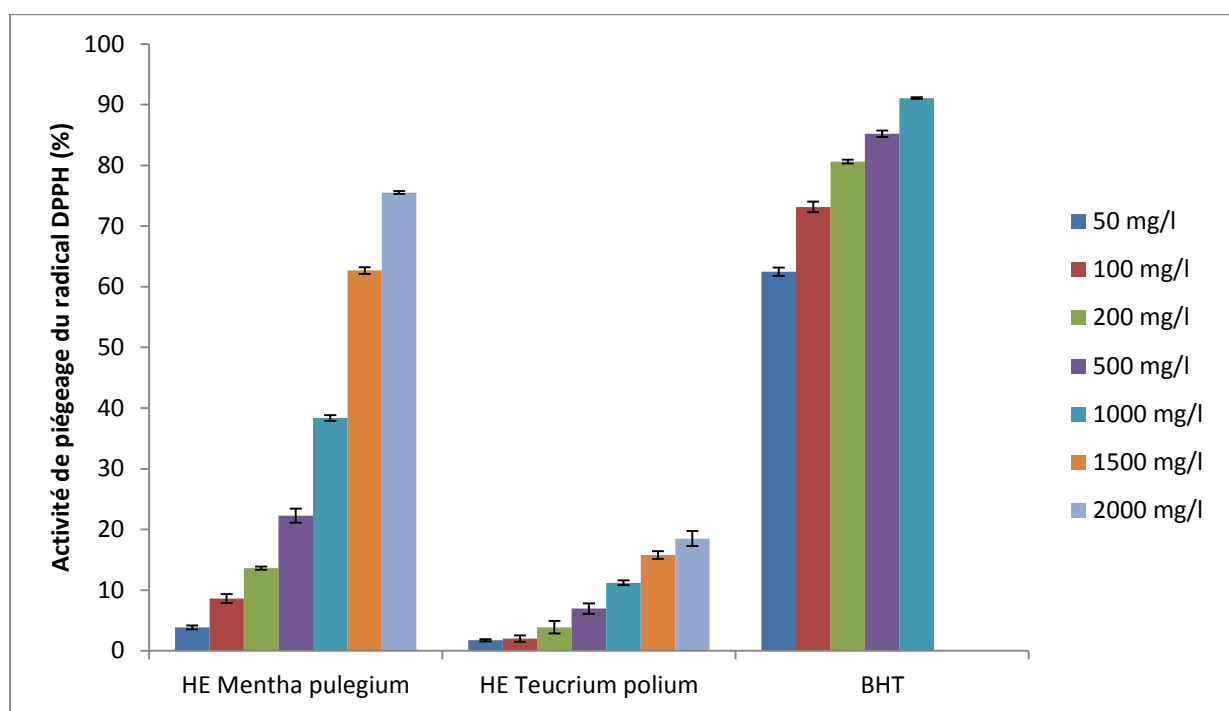


Figure 28 : Activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* et du BHT.

L'IC₅₀ exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre DPPH de 50%. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les valeurs de l'IC₅₀ des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* et du BHT sont indiquées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : L'IC₅₀ des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* et du BHT.

| Echantillons | IC ₅₀ (mg/l) |
|------------------------|-------------------------|
| <i>Mentha pulegium</i> | 1210.11±0.0 |
| <i>Teucrium polium</i> | ND |
| BHT | 27.99±0.0 |

ND : Non déterminée.

D'après les résultats mentionnés sur le Tableau 19, l'antioxydant de synthèse (BHT) montre une forte activité anti-radicalaire avec une valeur de l'IC₅₀ de 27.99±0.0 mg/l. La concentration de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* requise pour inhiber 50 % du radical libre DPPH est de 1210.11±0.0 mg/l, alors que celle de *Teucrium polium* n'a pas pu être déterminée étant donné que l'activité anti-radicalaire n'atteint même pas les 50 % et ceci même pour la plus forte concentration (2000 mg/l). L'activité de piégeage du radical DPPH peut être classée dans l'ordre suivant : BHT > HE *Mentha pulegium* > HE *Teucrium polium*. D'une manière générale, on pourrait dire que les huiles essentielles testées possèdent une faible activité anti-radicalaire comparée à celle du BHT et ceci pour toutes les concentrations utilisées.

D'après les résultats obtenus, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* montre une capacité anti-radicalaire appréciable vis-à-vis du radical DPPH. En effet, cette essence présente un pourcentage d'inhibition de 75.51±0.24% pour une concentration de 2000 µg/ml. De nombreuses études ont révélé que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* était capable d'agir comme piègeur de radicaux libres en réduisant le DPPH en diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune en donnant un atome d'hydrogène (Hajlaoui et al., 2009 ; Teixeira et al., 2012 ; Ouakouak et al., 2015 ; Abdelli et al., 2016). Les activités anti-radicalaires de cette essence sont nettement plus élevées que celles rapportées par Kamkar et al., (2010) pour la menthe

pouliot Iranienne ($IC_{50} = 14736 \pm 156 \mu\text{g/ml}$), mais beaucoup plus faibles que celles trouvées par **Ahmed et al.**, (2015) et **Salem et al.**, (2018) respectivement pour *Mentha pulegium* Saoudienne ($10.2 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$) et Tunisienne ($14 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$). Les différences constatées entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux rapportées par les auteurs précédents peuvent être expliquée par les variations de la composition chimique des huiles essentielles (**Lahlou**, 2004b).

L'huile essentielle de *Teucrium polium* révèle la plus faible activité anti-radicalaire dans notre étude. Effectivement, l'activité de piégeage du radical DPPH n'atteint qu'une valeur maximale de $18.49 \pm 1.23\%$ pour une concentration de 2000 mg/l de cette essence. Ce pourcentage d'inhibition est beaucoup plus faible que celui trouvé par **Bakari et al.**, (2015), qui est de 66.01% pour une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de l'huile essentielle de la germandrée cultivée en Tunisie.

Les activités antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques sont principalement attribuées aux composés actifs présents en elles (**Politeo et al.**, 2006 ; **Dhifi et al.**, 2016). En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent une activité anti-radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (**Benov**, 1994 ; **Miladi et al.**, 2013). En effet, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* qui a présenté la plus forte activité anti-radicalaire dans notre étude, est riche en monoterpènes oxygénés (89%). De plus, les composés tels que l'isomenthone (37.1%), la pulégone (34.8%) et la menthone (10.4%) sont connus pour leur grand potentiel antioxydant (**Mimica-Dukic et al.**, 2003 ; **Yadegarinia et al.**, 2006 ; **Hajlaoui et al.**, 2009 ; **Teixeira et al.**, 2012 ; **Gaeini et al.**, 2013 ; **Brahmi et al.**, 2016). Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet, et sont capable de fixer les radicaux libres pour les transformer en produits plus stables et d'arrêter la propagation de la réaction en chaîne (**Shahriar et al.**, 2013). Il a été établi dans de nombreuses études que l'activité antioxydante des huiles essentielles est non seulement liée au pourcentage élevé des composés majoritaires, mais aussi à la présence d'autres constituants minoritaires et des effets synergiques entre eux (**Abdalla et Roozen**, 1999 ; **Vardar-Ünlü et al.**, 2003 ; **Saint**, 2003 ; **Kalemba et Kunicka**, 2003 ; **Oussou**, 2009 ; **Oussou et al.**, 2010 ; **Mukazayire et al.**, 2011).

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* révèle une forte proportion en composés terpéniques hydrocarbonés (51.7%). La faible capacité de ces

terpènes à céder un atome d'hydrogène aux radicaux libres peut expliquer la faible activité antioxydante de l'huile essentielle de la germandrée (Mata et al., 2007).

2.5.1.2. Cas des extraits

➤ Menthe pouliot

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT sont illustrés par la Figure 29.

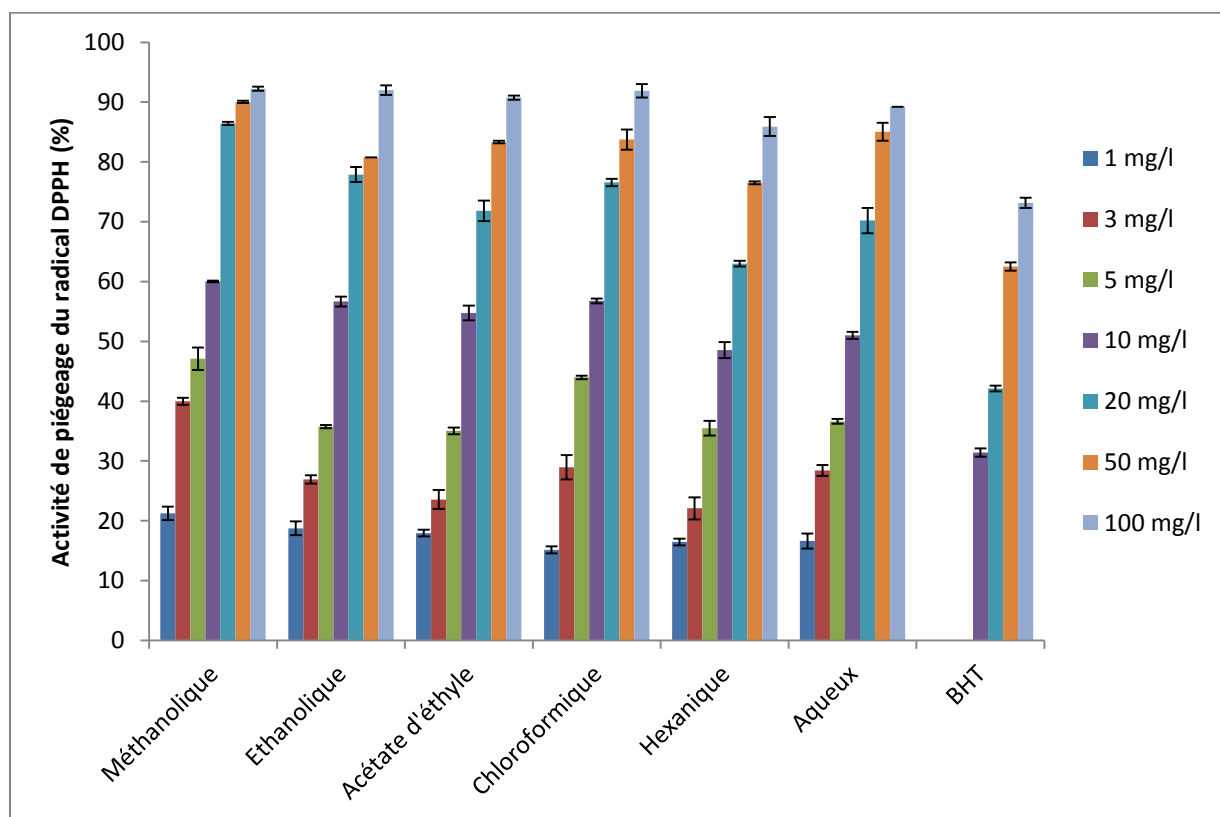


Figure 29 : Activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT.

Nous remarquons que tous extraits examinés sont capables de réduire le radical libre DPPH, en raison de leur aptitude à céder un atome d'hydrogène. Notons également que les différents extraits testés montrent une capacité de piégeage du radical DPPH dose-dépendante. Les valeurs de l'IC₅₀ des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT sont indiquées sur la Figure 30.

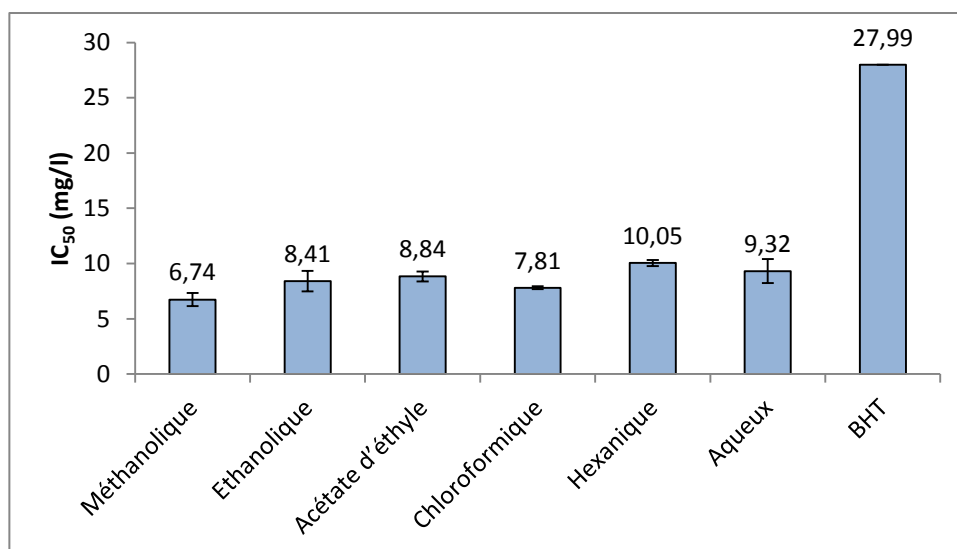


Figure 30 : L'IC₅₀ des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT.

Tous les extraits de *Mentha pulegium* révèlent une forte capacité à piéger le radical libre DPPH, avec des valeurs de l'IC₅₀ comprises entre 6.74±0.59 et 10.05±0.28 mg/l. Selon **Adaramola** et **Onigbinde** (2017), la variabilité de l'activité antioxydante entre les différents extraits testés peut être attribuée à l'utilisation de solvants de différentes polarités pour l'extraction des composés antioxydants. L'activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits examinés diminue dans l'ordre suivant: l'extrait méthanolique > chloroformique > éthanologique > acétate d'éthyle > aqueux > hexanique.

D'après les résultats enregistrés, nous remarquons que tous les extraits testés présentent une activité anti-radicalaire supérieure à celle du BHT (IC₅₀ de 27.99±0.0 mg/l). Les résultats du test de piégeage du radical libre DPPH ont également révélé que parmi tous les extraits examinés, l'extrait méthanolique présente le meilleur potentiel antioxydant (IC₅₀ de 6.74±0.59 mg /l). Cette forte capacité anti-radicalaire pourrait être attribuée à sa forte teneur en polyphénols totaux (Tableau 17). Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté qu'il existe une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques (**Sadeghi** et al., 2015 ; **Qasim** et al., 2016 ; **Al-Rimawi** et al., 2017).

Viuda-Martos et al. (2011) ont montré que la teneur en composés phénoliques peut être utilisée comme un indicateur important de la capacité antioxydante des plantes et peut également servir comme écran préliminaire pour tout produit destiné à être utilisé comme source naturelle d'antioxydants dans les aliments fonctionnels. Les polyphénols possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques, un système aromatique conjugué étendu pour délocaliser un

électron non apparié, et un ou plusieurs groupes hydroxyles qui sont capables de donner un atome d'hydrogène ou un électron à un radical libre; par conséquent, ils possèdent une structure idéale pour les activités de piégeage des radicaux libres (Skrovankova et al., 2012). Cette structure des composés phénoliques est une clé déterminante de leur activité de piégeage des radicaux libres, c'est ce qui est appelé les relations structure-activité (Balasundram et al., 2006). Par exemple, dans le cas des acides phénoliques, l'activité antioxydante dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles par rapport à la fonction carboxyle (Rice-Evans et al., 1996 ; Robards et al., 1999).

➤ Germandrée tomenteuse

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de *Teucrium polium* et du BHT sont représentés sur la Figure 31. Nous constatons que tous les extraits de la germandrée testés réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à donner l'hydrogène. Ces extraits ont également montré une activité anti-radicalaire dose-dépendante.

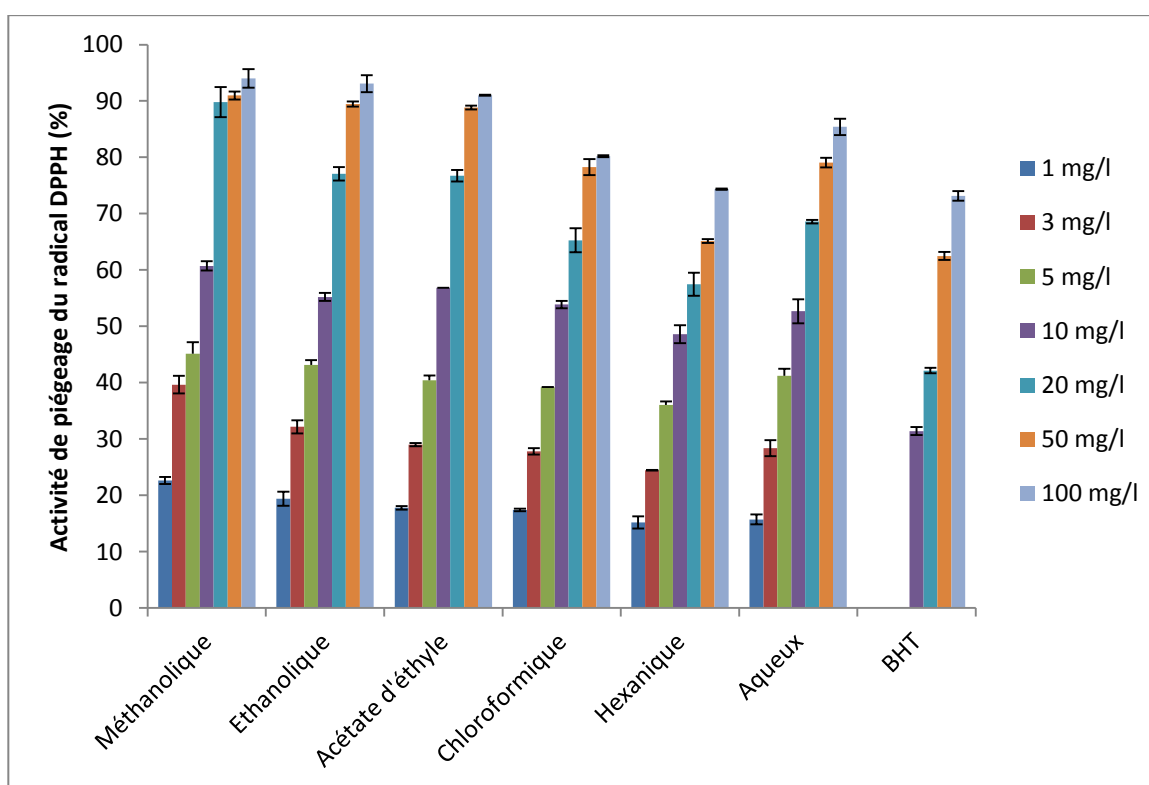


Figure 31 : Activité de piégeage su radical DPPH des différents extraits de *Teucrium polium* et du BHT.

Les valeurs de l'IC₅₀ des différents extraits de *Teucrium polium* et du BHT sont illustrées dans la Figure 32.

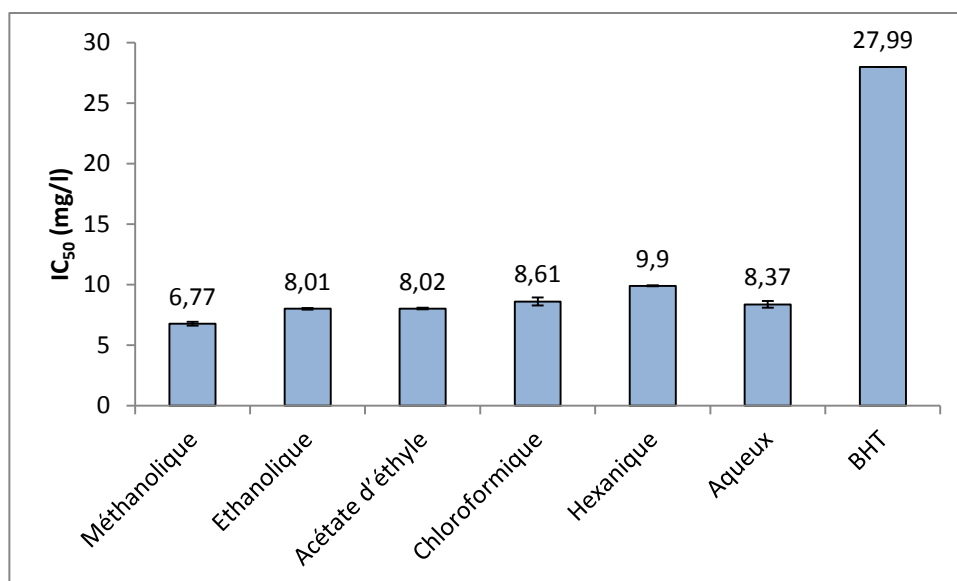


Figure 32 : L'IC₅₀ des différents extraits de *Teucrium polium* et du BHT.

D'après les résultats illustrés sur la Figure 32, nous constatons que les différents extraits de la germandrée présentent une forte activité de piégeage du radical DPPH, avec des valeurs de l'IC₅₀ allant de 6.77±0.15 à 9.90±0.04 mg/l. L'activité anti-radicalaire des différents extraits de la germandrée diminue comme suit : l'extrait méthanolique > éthanologique > acétate d'éthyle > aqueux > chloroformique > hexanique. Nous remarquons également que tous les extraits examinés présentent une activité de piégeage du radical DPPH supérieure à celle de l'antioxydant de référence BHT (IC₅₀ = 27.99±0.0 mg/l) et ceci quel que soit la concentration utilisée. Notons, par ailleurs, que l'extrait méthanolique présente la plus grande activité anti-radicalaire (IC₅₀ = 6.74±0.59 mg/l), ce qui est probablement due à sa teneur élevée en polyphénols totaux (206.95±1.82 mg d'EAG/g d'extrait).

2.5.2. Activité de piégeage du radical 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+})

Le test de piégeage du radical libre ABTS^{•+} est utilisé pour mesurer l'activité antioxydante in vitro des huiles essentielles et des différents extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*. Le radical cation ABTS^{•+} est réactif vis-à-vis de la plupart des antioxydants, y compris les composés phénoliques, les thiols et la vitamine C (Gupta et al., 2016). Les antioxydants présents dans les huiles essentielles et les extraits testés réagissent avec le radical cation ABTS^{•+} (couleur bleu /vert foncé) et le reconvertissent en sa forme neutre incolore, par leur capacité à donner de l'hydrogène (Boligon et al., 2014).

2.5.2.1. Cas des huiles essentielles

Les activités de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sont illustrées dans la Figure 33. Les activités anti-radicalaires du Trolox, utilisé comme témoin positif, sont décrites sur la Figure 3, (annexe).

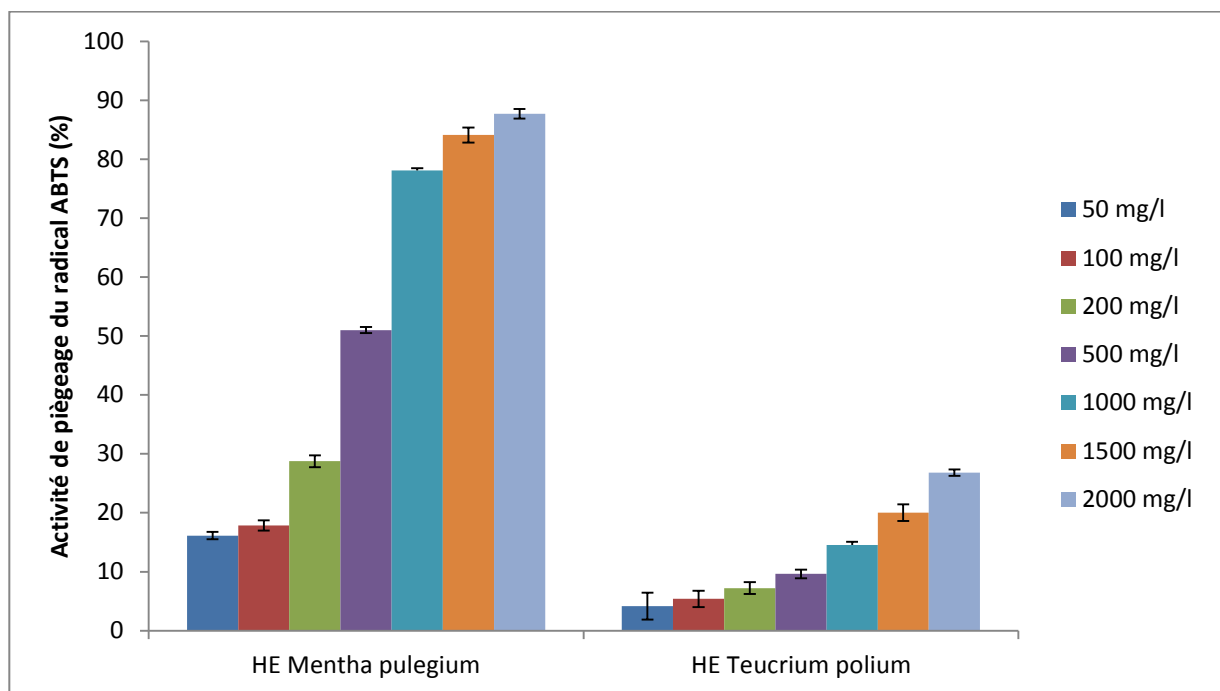


Figure 33 : Activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*.

Les valeurs de l' IC_{50} des huiles essentielles de la menthe pouliot et de la germandrée ainsi que celles du Trolox sont indiquées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : L' IC_{50} des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Teucrium polium* et du Trolox.

| Echantillons | IC_{50} (mg/l) |
|------------------------|------------------|
| <i>Mentha pulegium</i> | 484.03 ±0.78 |
| <i>Teucrium polium</i> | ND |
| Trolox | 0.82±0.0 |

ND : Non déterminée.

D'après les résultats rapportés par le Tableau 20, les valeurs de l'IC₅₀ du Trolox et de l'huile essentielle de la menthe pouliot sont respectivement de 0.82±0.0 et 484.03±0.78 mg/l. Par contre, l'IC₅₀ de l'huile essentielle de la germandrée n'a pas pu être déterminée en raison de sa faible activité anti-radicalaire vis-à-vis de l'ABTS^{•+}, qui reste inférieure à 50% même à la plus forte concentration (2000 mg/l). La capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} diminue dans l'ordre suivant : Trolox > HE *Mentha pulegium* > HE *Teucrium polium*. Notons, que les huiles essentielles testées dans la présente étude révèlent une faible activité anti-radicalaire comparée à celle du Trolox.

Nous constatons que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* présente un bon potentiel antioxydant contre le radical ABTS^{•+} avec un pourcentage d'inhibition de 87.71±0.82%, pour une concentration de 2000 µg/ml. L'activité de piégeage du radical libre ABTS^{•+} de l'huile essentielle de la menthe pouliot analysée dans notre étude est plus faible que celle obtenue par **Brahmi et al.** (2016), qui ont trouvé que la concentration requise pour inhiber 50% du cation ABTS^{•+} est de 57.4±1.9% µg/ml. Nous remarquons également que l'huile essentielle de *Teucrium polium* montre la plus faible inhibition du radical ABTS^{•+} (26.81±0.55% à une concentration de 2000 mg/l). À notre connaissance, il n'y a pas de rapport dans la littérature sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la germandrée en utilisant le test de l'ABTS^{•+}.

Notons, par ailleurs, que les activités antioxydantes des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* trouvées sur la base du test ABTS^{•+} confirment celles obtenus par la méthode de piégeage du radical DPPH. Cependant, les valeurs obtenues en utilisant l'ABTS^{•+} sont supérieures à celles trouvées en utilisant le test de DPPH. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Rajurkar et Hande**, (2011) et **Vamanu et Nita**, (2013). Cette supériorité peut être due à la faible sensibilité des radicaux DPPH et à la lenteur de leur vitesse réactionnelle avec la plupart des biomolécules comparée à celle des radicaux ABTS^{•+} (**Binsan et al.**, 2008 ; **Martysiak-Zurowska et Wentz**, 2012).

2.5.2.2. Cas des extraits

➤ Menthe pouliot

Les activités de piégeage des radicaux ABTS^{•+} des différents extraits de *Mentha pulegium* et du Trolox sont illustrées sur la Figure 34.

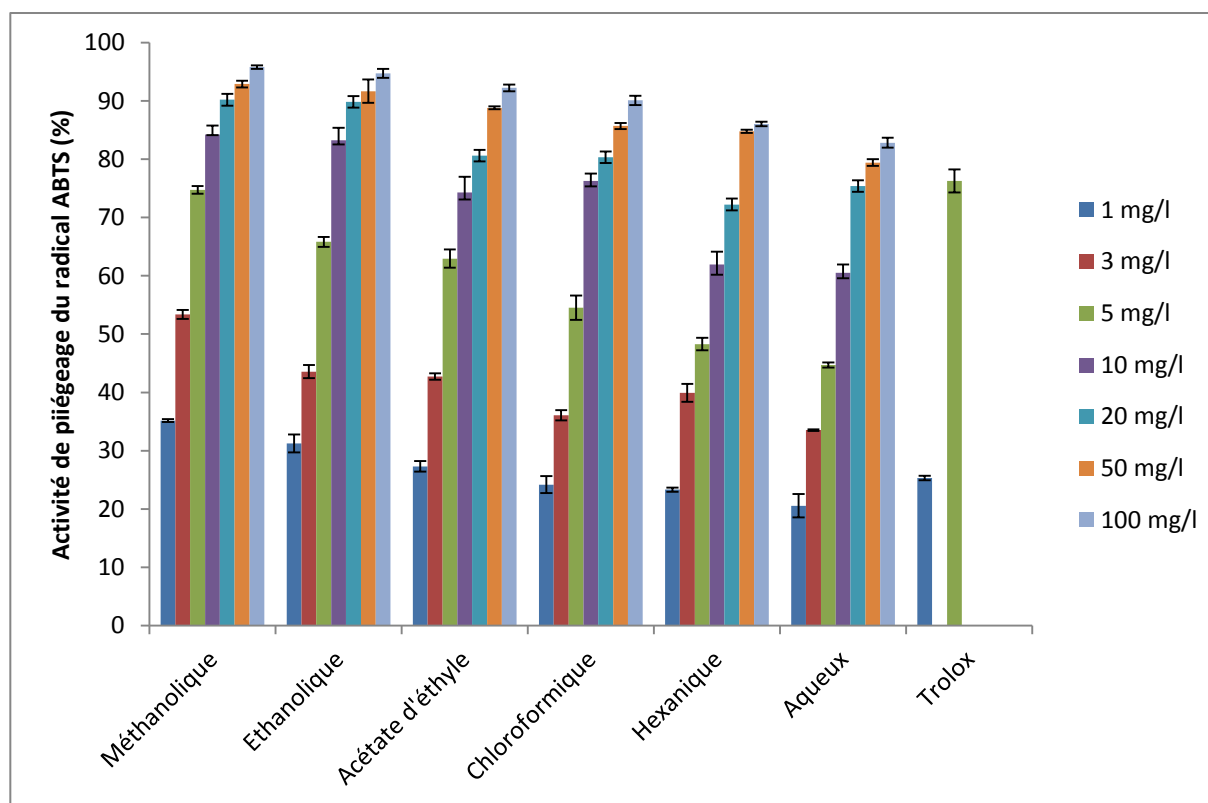


Figure 34 : Activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ des différents extraits de *Mentha pulegium* et du Trolox.

D'après les résultats décrits par la Figure 34, nous remarquons que les différents extraits examinés présentent une inhibition dose-dépendante des radicaux $ABTS^{\bullet+}$. Les valeurs de l' IC_{50} des différents extraits de la menthe pouliot et du Trolox sont indiquées sur la Figure 35. Les différents extraits étudiés possèdent une forte activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$, avec des valeurs de l' IC_{50} comprises entre 2.55 ± 0.75 et 7.11 ± 0.22 mg/l. Tous les extraits de la menthe pouliot testés montrent une activité de piégeage inférieure à celle de l'antioxydant synthétique Trolox ($IC_{50} = 0.82 \pm 0.0$ mg/l) et ceci quel que soit la concentration utilisée. Par ailleurs, l'activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ des extraits de la menthe pouliot étudiés diminue dans l'ordre suivant : méthanologique > éthanologique > acétate d'éthyle > chloroformique > hexanique > aqueux. Notons également que l'extrait méthanologique présente la plus forte activité anti-radicalaire lorsqu'il réagit avec l' $ABTS^{\bullet+}$ ($IC_{50} = 2.55 \pm 0.75$ mg/l), en raison de sa forte teneur en composés phénoliques (197.86 ± 2.54 mg d'EAG/g d'extrait). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Khorasani Esmaili et al.**, (2015), qui ont montré que l'extrait méthanologique de *Trifolium pratense* (Trèfle rouge) possède la plus forte activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ comparée aux autres extraits testés.

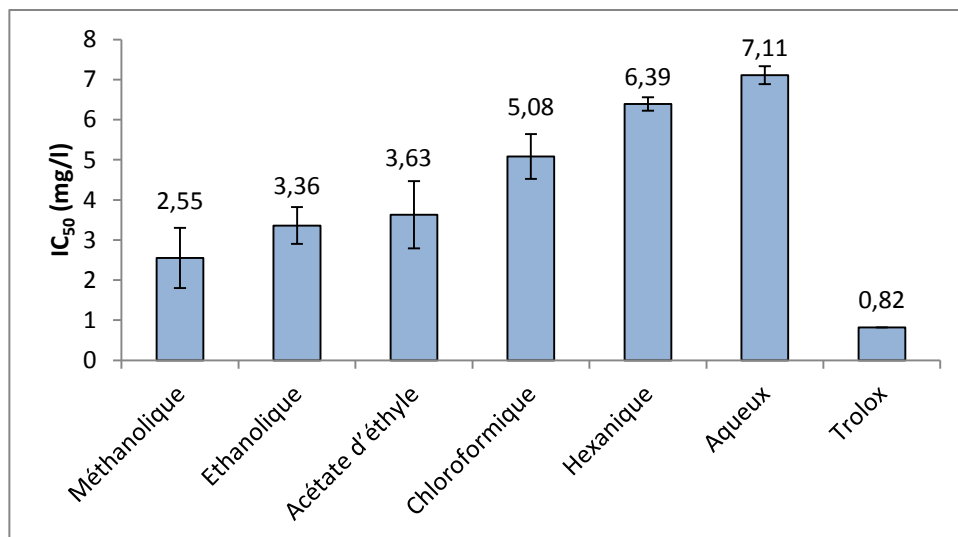


Figure 35 : L'IC₅₀ des différents extraits de *Mentha pulegium* et du Trolox.

➤ Germandrée tomenteuse

Les activités de piégeage du radical ABTS^{•+} des différents extraits de *Teucrium polium* et du Trolox sont illustrées sur la Figure 36. Tous les extraits examinés montrent un effet scavenger dose-dépendant.

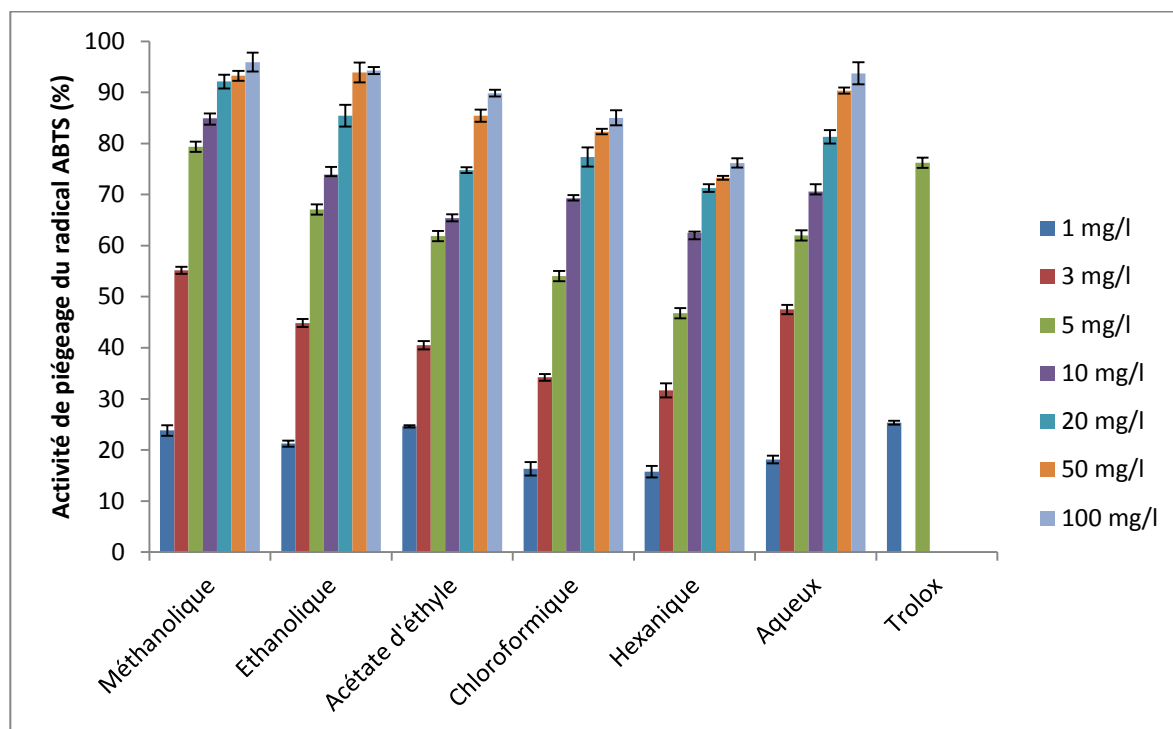


Figure 36: Activité de piégeage du radical ABTS^{•+} des différents extraits de *Teucrium polium* et du Trolox.

D'après les résultats indiqués sur la Figure 37, les différents extraits de la germandrée montrent une forte capacité à piéger le cation libre $ABTS^{\bullet+}$, avec des valeurs de l' IC_{50} allant de 2.79 ± 0.07 à 6.90 ± 0.05 mg/l. Nous remarquons que tous les extraits testés possèdent une activité de piégeage du radical libre $ABTS^{\bullet+}$ inférieure à celle de l'antioxydant de référence Trolox ($IC_{50} = 0.82 \pm 0.0$ mg/l). Cependant, à une concentration de 5 mg/l, l'extrait méthanolique présente une activité anti-radicalaire comparable à celle du standard Trolox. L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Teucrium polium* vis-à-vis de l' $ABTS^{\bullet+}$ s'est révélée efficace dans l'ordre suivant : l'extrait méthanolique > éthanolique > aqueux > acétate d'éthyle > chloroformique > hexanique. Notons que parmi les six extraits testés, l'extrait méthanolique présente la plus forte activité de piégeage du radical libre $ABTS^{\bullet+}$ ($IC_{50} = 2.79 \pm 0.07$ mg/l). Ceci est dû à la présence d'une quantité élevée de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans cet extrait (Tableau 18).

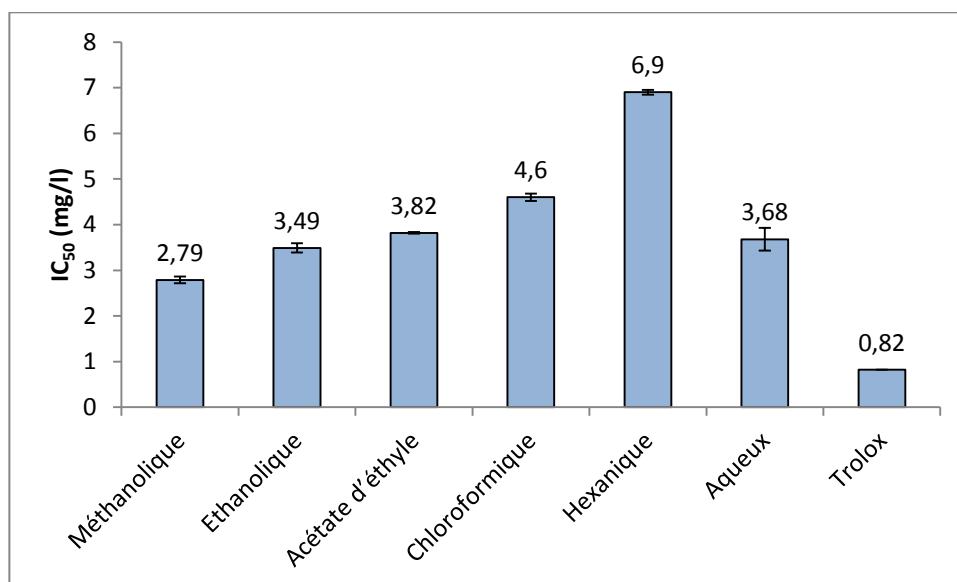


Figure 37 : L' IC_{50} des différents extraits de *Teucrium polium* et du Trolox.

2.5.3. Pouvoir réducteur

Une autre méthode pour évaluer la capacité antioxydante est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{+2}), dans laquelle la couleur jaune de la solution d'essai change en différentes nuances de bleu, en fonction du pouvoir réducteur de chaque échantillon. La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante (Meir et al., 1995).

Le test du pouvoir réducteur est souvent utilisé pour évaluer la capacité d'un extrait à donner un électron, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique (Nabavi et al., 2009). L'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique une augmentation de la capacité réductrice. Ce pouvoir réducteur est généralement corrélé avec la composition des huiles essentielles et des extraits de plantes, qui peut être affectée par la variété, le climat et les conditions de stockage (Kadri et al., 2011).

2.5.3.1. Cas des huiles essentielles

Les résultats du pouvoir réducteur des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* ainsi que ceux du BHT exprimés en absorbance à 700 nm sont représentés sur la Figure 38.

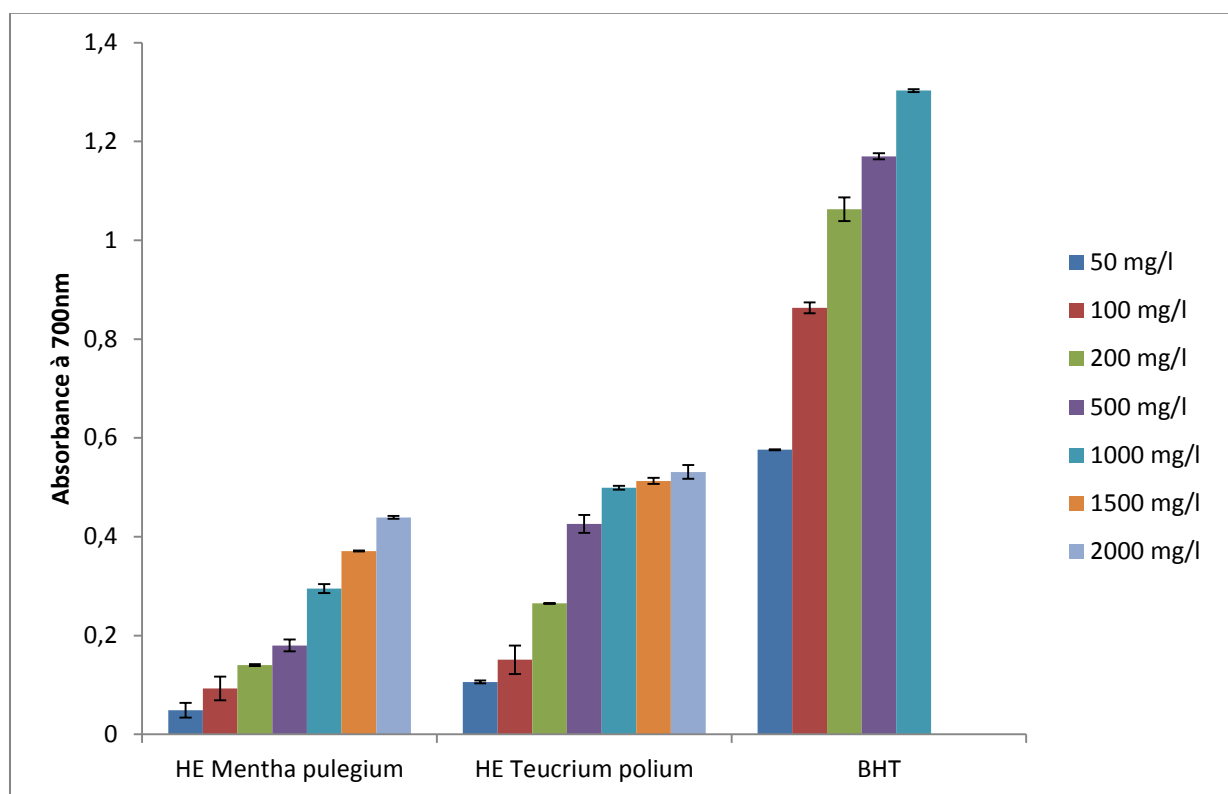


Figure 38 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* et du BHT.

D'après les résultats indiqués sur la Figure 38, nous constatons que le pouvoir réducteur augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration des échantillons. Nous remarquons également que les huiles essentielles de la menthe pouliot et de la germandrée présentent une capacité réductrice inférieure à celle du standard BHT et ceci quel que soit la concentration utilisée.

Le pouvoir réducteur diminue dans l'ordre suivant : BHT > HE *Teucrium polium* > HE *Mentha pulegium*. La faible capacité réductrice de ces deux essences pourrait être due à leur faible teneur en composés phénoliques. En effet, il a été établi qu'un pouvoir réducteur puissant serait probablement lié à la présence des composés phénoliques possédant des liaisons chimiques délocalisées (Cristina et al., 2004 ; Shahdadi et al., 2015). Dans la littérature, de nombreux travaux ont révélé la faible capacité réductrice des huiles essentielles de *Mentha pulegium* (Sarikurkcu et al., 2012 ; Cherrat et al., 2014 ; Silva et al., 2015 ; Bouyahya et al., 2017) et de *Teucrium polium* (Bakari et al., 2015).

Par ailleurs, nous constatons que l'huile essentielle de la menthe pouliot révèle un potentiel antioxydant moins important dans le test du pouvoir réducteur par rapport aux deux tests précédents (DPPH et ABTS^{•+}). Il a été établi que l'activité antioxydante des huiles essentielles est influencée par les méthodes de mesures utilisées (Takayama et al., 2016). Selon Ballester-Costa et al., (2017), la différence de la capacité antioxydante des huiles essentielles en fonction des méthodes de mesure utilisées pourrait s'expliquer par les différents mécanismes impliqués dans chaque test correspondant.

2.5.3.2. Cas des extraits

Le pouvoir réducteur est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes (Raman et al., 2016). Dans le test du pouvoir réducteur, la présence d'antioxydants dans les extraits de plantes provoque la réduction du fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) en donnant un électron.

➤ Menthe pouliot

Les résultats du pouvoir réducteur des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT exprimés par l'absorbance à 700 nm sont illustrés sur la Figure 39.

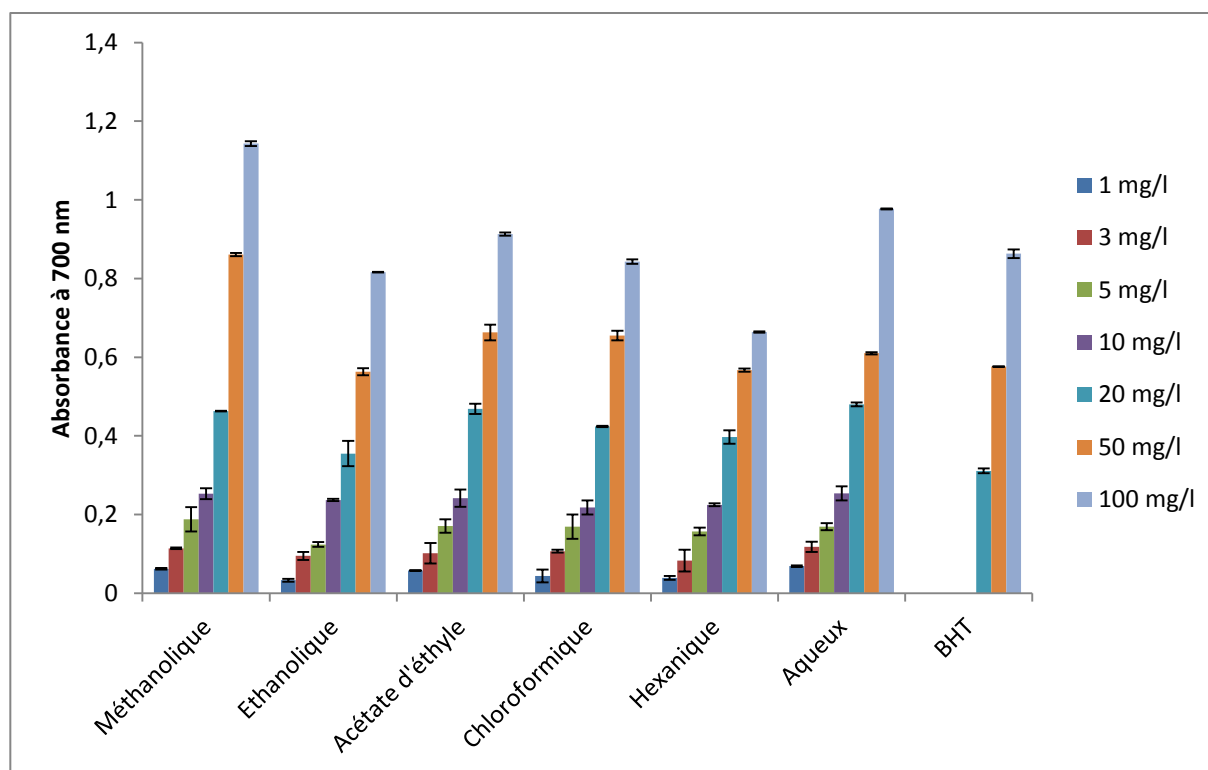


Figure 39 : Pouvoir réducteur des différents extraits de *Mentha pulegium* et du BHT.

Selon les résultats obtenus, le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. Nous constatons que tous les extraits de la menthe pouliot examinés présentent un pouvoir réducteur puissant. Cette forte capacité réductrice pourrait donc s'expliquer par la grande quantité de réductones contenus dans les différents extraits de *Mentha pulegium*. Par conséquent, ces extraits peuvent agir comme donneurs d'électrons et sont capables de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et ensuite mettre fin aux réactions en chaîne des radicaux libres (Irshad et al., 2012). Par ailleurs, le pouvoir réducteur des différents extraits testés peut être classée dans cet ordre : l'extrait méthanolique > aqueux > acétate d'éthyle > éthanologique > chloroformique > hexanique. Toutefois, nous remarquons que l'extrait méthanolique possède la plus forte capacité réductrice comparée aux autres extraits et au BHT et ceci qu'elle que soit la concentration utilisée. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Pavithra et Vadivukkarasi (2015) sur les feuilles de *Kedrostis foetidissima*, qui ont indiqué que l'extrait méthanolique présente la plus forte capacité réductrice par rapport aux autres extraits examinés. Certains auteurs ont attribué une telle capacité à la teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique (Butsat et Siriamornpun, 2010 ; Khorasani Esmaeili et al., 2015).

➤ Germandrée tomenteuse

Les différents extraits de *Teucrium polium* ont été également soumis à un criblage pour leur éventuelle activité antioxydante par le test du pouvoir réducteur. Les capacités réductrices des différents extraits de la germandrée sont illustrées sur la Figure 40.

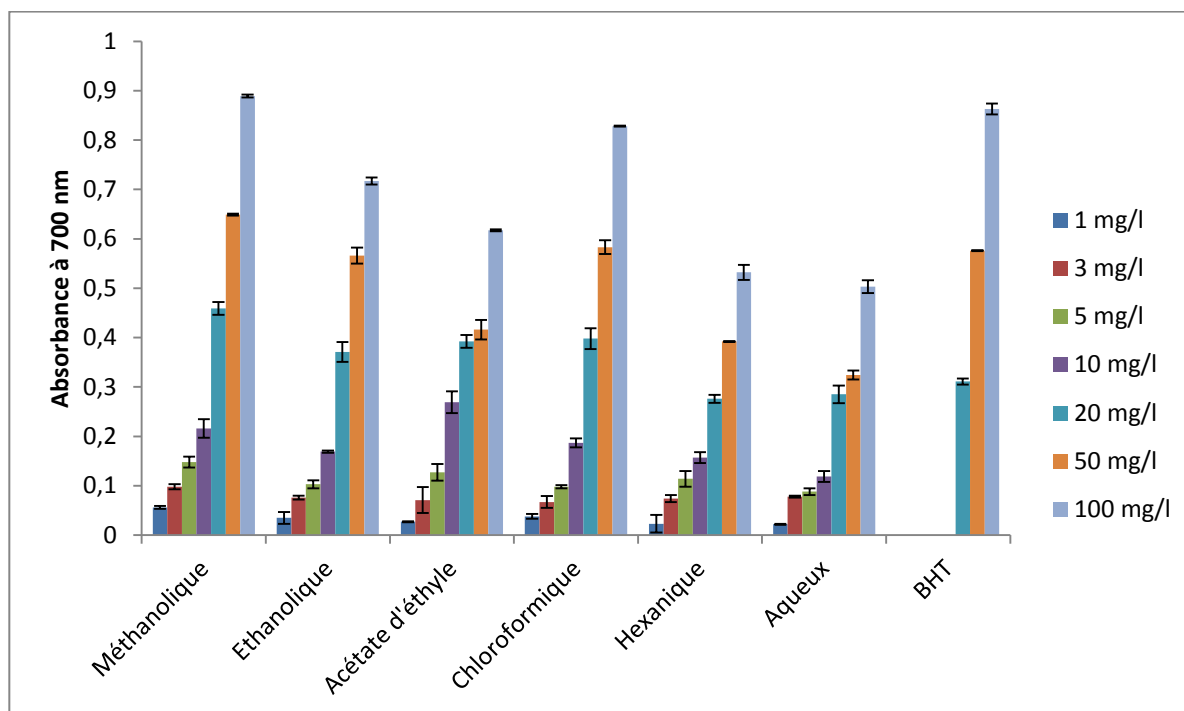


Figure 40: Pouvoir réducteur des différents extraits de *Teucrium polium* et du BHT.

D'après les résultats décrits sur la Figure 40, tous les extraits de la germandrée montrent une bonne capacité réductrice. L'augmentation de la concentration des extraits augmente le pouvoir réducteur. La capacité antioxydante des différents extraits examinés par la mesure du pouvoir réducteur peut être classée dans l'ordre suivant: l'extrait méthanolique > chloroformique > éthanolique > acétate d'éthyle > hexanique > aqueux. Nous constatons que l'extrait méthanolique montre la capacité réductrice la plus élevée par rapport aux autres extraits examinés et au standard BHT. Cette forte activité pourrait être attribuée à la teneur élevée en polyphénols totaux de cet extrait (206.95 ± 1.82 mg d'EAG/g d'extrait).

En général, nous pouvons déduire que les différents extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* examinés dans notre étude présentent une meilleure activité antioxydante que celle des huiles essentielles. Ceci serait probablement dû à la présence en teneur élevée des composés phénoliques dans les extraits des plantes étudiés. De nombreuses recherches ont

confirmé la supériorité de la capacité antioxydante des extraits par rapport aux huiles essentielles des mêmes plantes (**Kamkar** et al., 2010 ; **Sarikurkcü** et al., 2012 ; **Teixeira** et al., 2012 ; **Bakari** et al., 2015).

2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Mentha pulegium* et *Teucrium polium* est déterminée qualitativement par la mesure des diamètres des zones d'inhibition et quantitativement à travers la détermination des valeurs des CMI et CMB. Afin d'évaluer in vitro le pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées, trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus*) et une levure (*Candida albicans*) sont examinées. Ces souches testées proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie du **CRD SAIDAL**.

2.6.1. Etude qualitative des huiles essentielles et des extraits testés

La détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées est effectuée par la méthode des disques (aromatogrammes). Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition (mm).

2.6.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées

La mesure du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis de l'huile essentielle utilisée (**Fertout-Mouri** et al., 2016).

Les résultats des mesures des diamètres des zones d'inhibition (mm) des huiles essentielles de la menthe pouliot et de la germandrée sur les souches testées sont résumés sur la Figure 41. Notons que les diamètres d'inhibition dépendent de l'huile essentielle examinée et de la sensibilité des souches testées. Les résultats obtenus lors de l'étude qualitative des huiles essentielles de la menthe pouliot et de la germandrée sont représentés sur les Figures 4-7, (annexe).

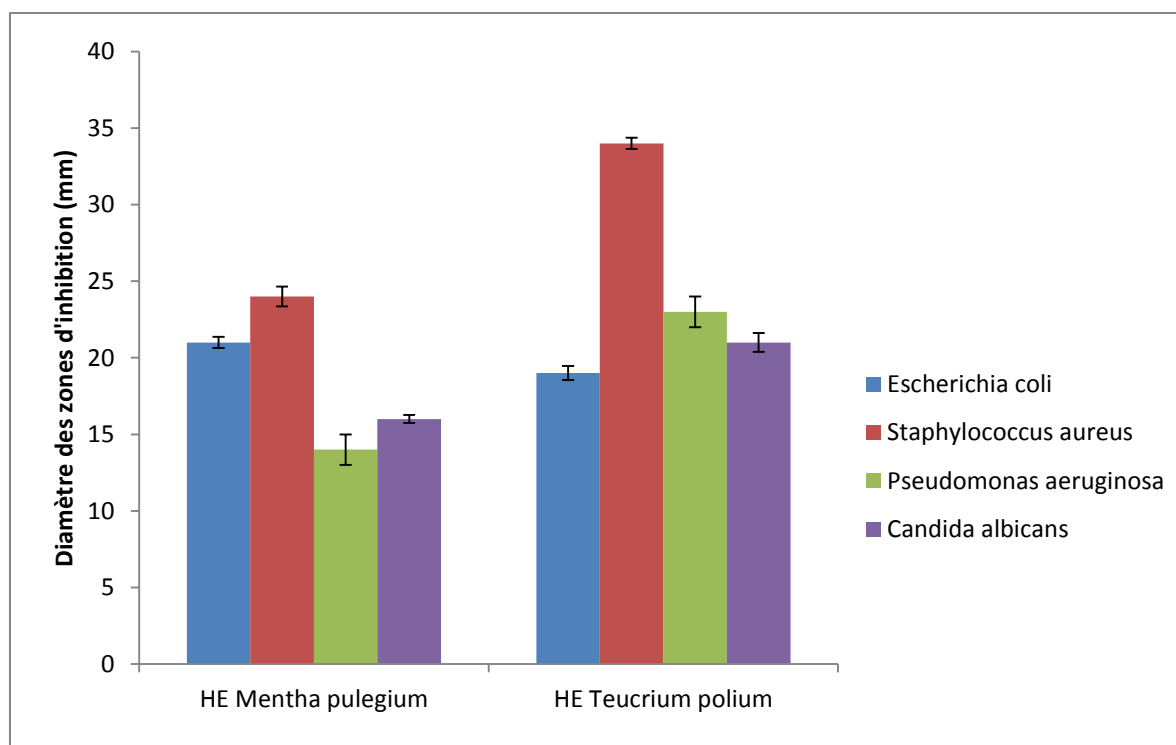


Figure 41 : Zones d'inhibition des souches testées produites par les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*.

➤ Cas de la menthe pouliot

D'après les résultats illustrés sur la Figure 41, l'huile essentielle de la menthe pouliot génère des zones d'inhibition contre toutes les souches testées comprises entre 14 ± 0.55 et 24 ± 0.65 mm, dont le diamètre le plus important concernait *Staphylococcus aureus*. En se basant sur l'échelle de mesure donnée par **Meena** et **Sethi** (1994) et **Ela** et *al.*, (1996), nous remarquons que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* présente une activité inhibitrice modérée vis-à-vis d'*E. coli* (21 ± 0.36 mm), *Staphylococcus aureus* (24 ± 0.65 mm) et *Candida albicans* (16 ± 0.26 mm), et une faible activité sur *Pseudomonas aeruginosa* (14 ± 0.55 mm). Dans notre étude, *Pseudomonas aeruginosa* s'est avéré être la souche la plus résistante à l'huile essentielle de la menthe pouliot. Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres études, qui ont rapporté la faible sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (**Ait-Ouazzou** et *al.*, 2012 ; **Abdelli** et *al.*, 2016).

Il est généralement connu que les bactéries Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram positif (**Trombetta** et *al.*, 2005 ; **Su** et *al.*, 2012). Dans ce sens, certaines études suggèrent que la différence de sensibilité aux antimicrobiens entre les

bactéries Gram positif et Gram négatif pourrait être attribuée à la structure et à la composition de l'enveloppe cellulaire (membrane cytoplasmique et/ou membrane externe et paroi cellulaire) (Shrivastava et al., 2007 ; Tamboli et Lee, 2013 ; Yala et al., 2016). La paroi cellulaire des bactéries Gram positif est constituée exclusivement d'une couche épaisse de peptidoglycanes qui semble être plus favorable à la pénétration des huiles essentielles, qui peuvent facilement atteindre leurs cibles intracellulaires. L'effet de ces biomolécules dépend de la quantité des composés présents; à de faibles concentrations, ils peuvent interférer avec les enzymes impliquées dans la production d'énergie, et à des concentrations plus élevées, ils peuvent dénaturer les protéines (Tiwari et al., 2009). Par contre, la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif est plus complexe. Elle est constituée d'une fine couche de peptidoglycane adjacente à la membrane cytoplasmique et d'une membrane externe composée de phospholipides et de lipopolysaccharides (Nazzaro et al., 2013). Ces bactéries Gram négatif peuvent interférer avec les molécules hydrophobes des huiles essentielles et rendre leur passage à travers la paroi difficile (Tian et al. 2009 ; Vijayarathna et al. 2012).

De nombreuses études ont révélé que l'huile essentielle de la menthe pouliot possède des activités antibactériennes et antifongiques. Il est cependant important de noter que les résultats obtenus dans notre étude quant à cet effet antibactérien de l'essence de *Mentha pulegium* sont quelque peu différents de ceux rapportés par certaines études antérieures. Selon Bouyahia et al., (2017), la variabilité des résultats obtenus pourrait être due à la composition chimique des huiles essentielles étudiées, aux souches bactériennes testées et aux méthodes utilisées. Marzouk et al., (2008) ont montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Tunisie est active contre toutes les souches bactériennes testées, avec des diamètres d'inhibition allant de 10 à 20 mm. Mahboubi et Haggi, (2008) ont rapporté que l'essence de la menthe pouliot d'Iran exerce un effet antimicrobien significatif contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* et *Vibrio cholerae* avec un diamètre d'inhibition qui varie de 13 à 21 mm. Ait-Ouazzou et al., (2012) ont indiqué que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* du Maroc génère des diamètres d'inhibition contre une gamme de bactéries allant de 12.6 ± 0.5 mm à 35.6 ± 0.6 mm. Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* y était résistante. Selon l'étude menée par Cherrat et al., (2014), l'huile essentielle de la menthe pouliot du Maroc inhibe la croissance de toutes les souches bactériennes testées, avec des zones d'inhibition allant de 12.5 à 37.5 mm. Selon Ghazghazi et al., (2013), l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Tunisie est très efficace contre les bactéries Gram positive (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphyococcus aureus*) et Gram négative (*E. coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*) avec des diamètres d'inhibition compris entre 16 et 30 mm. **Abdelli et al.**, (2016) ont trouvé que les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* (23±1 mm) et *Bacillus subtilis* (24±0.0 mm), sont extrêmement sensibles à l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Bouira. Concernant les bactéries Gram négatif, il a été observé que cette essence possède des effets inhibiteurs significatifs contre *E. coli* (28±0.0 mm) et *Salmonella enteritidis* (25±1.73 mm). Toutefois, la souche *Pseudomonas aeruginosa* y était résistante. Quant à l'activité des levures, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* sont très sensibles à l'huile essentielle de la menthe pouliot.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est attribuée à sa composition chimique (**Teixeira et al.**, 2012). Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles dépendent principalement de leurs composants bioactifs uniques qui sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes et/ou de détruire complètement les pathogènes (**Elshafie et al.**, 2015, 2016). Il a été prouvé que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est souvent la résultante de l'activité des monoterpènes plutôt que celle des sesquiterpènes (**Burt**, 2004 ; **Tajkarimi et al.**, 2010). Par ailleurs, les monoterpènes oxygénés sont nettement plus actifs que les monoterpènes hydrocarbonés (**Carson et Riley**, 1995). Par conséquent, l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Mentha pulegium* révèle de fortes activités antibactériennes et antifongiques, dues à la présence d'une teneur élevée en monoterpènes oxygénés (89%). En effet, cette essence est riche en isomenthone (37.1 %), en pulégone (34.8 %) et en menthone (10.4 %) qui ont déjà été signalées comme agents antibactériens et antifongiques (**Oumzil et al.**, 2002 ; **Mimica-Dukic et al.**, 2003 ; **Sahin et al.**, 2003 ; **Gulluce et al.**, 2007 ; **Hajlaoui et al.**, 2008, 2009, 2010 ; **Teixeira et al.**, 2012).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est principalement lié à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries (**Boutabia et al.**, 2016). Plusieurs cibles sont décrites pour les huiles essentielles, à savoir la déstabilisation des membranes bactériennes, l'endommagement des protéines membranaires, la réduction de la force motrice des protons et la libération du contenu cellulaire (**Ultee et al.**, 1999, 2001 ; **Turgis et al.**, 2009 ; **Gallucci et al.**, 2009 ; **Devi et al.**, 2010 ; **Bajpa et al.**, 2013). Dans la plupart des cas, les huiles essentielles confèrent une activité antimicrobienne en endommageant la paroi cellulaire et les membranes, ce qui conduit à la lyse cellulaire et à la fuite du contenu cellulaire (**Burt**, 2004). Le mode d'action antimicrobien des huiles essentielles et des composés bioactifs

correspondants dépend de leur composition chimique et de la quantité des composés individuels (**Lopez-Romero et al.**, 2015). En outre, la présence et l'emplacement des groupes fonctionnels dans la molécule peuvent affecter sa bioactivité (**Nazzaro et al.**, 2013).

➤ Cas de la germandrée tomenteuse

D'après les résultats décrits sur la Figure 41, nous constatons que l'huile essentielle de *Teucrium polium* possède un large spectre d'action contre toutes les souches testées, en particulier sur *Staphylococcus aureus* qui s'est avéré être la souche la plus sensible vis-à-vis de cette essence, avec un diamètre d'inhibition de 34 ± 0.36 mm. Toutefois, l'huile essentielle de *Teucrium polium* montre une activité inhibitrice modérée sur *E. coli* (19 ± 0.46 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (23 ± 0.80 mm) et *Candida albicans* (21 ± 0.61 mm). Par ailleurs, l'étude comparative des résultats obtenus avec ceux de la littérature a montré une variabilité de cette activité antimicrobienne en fonction de la composition chimique de l'essence de *Teucrium polium* et la susceptibilité des souches testées. **Djabou et al.**, (2012) ont rapporté que l'huile essentielle de *Teucrium polium* de Corse induit une inhibition de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 18 ± 2.1 mm. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude. Selon **Belmekki et al.**, (2013), l'huile essentielle de la germandrée de Tlemcen inhibe la croissance d'*E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en produisant un diamètre d'inhibition entre 09 et 16 mm. L'huile essentielle de *Teucrium polium* de Sétif exerce une forte action bactériostatique contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* (**Lograda et al.**, 2014). Les résultats obtenus par **Fertout-Mouri et al.** (2016) ont montré que l'huile essentielle de *Teucrium polium* du mount de Tessala exhibe un large spectre d'inhibition vis-à-vis de certaines souches testées. En effet, son activité est maximale sur *Staphylococcus aureus* et moyenne sur *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans notre étude. Selon les résultats rapportés par **Smahane et al.** (2016), l'huile essentielle de la germandrée du Maroc présente une activité inhibitrice significative contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Toutefois, les bactéries Gram négatif (*E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) y étaient résistantes.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* pourrait s'expliquer par la présence du t-cadinol (17.9 %), de la germacrène D (16.1 %) et de la β -pinène (9.7 %), dont l'activité bactériostatique a été démontrée contre de nombreux micro-organismes (**Ngassapa et al.**, 2003 ; **Kabouche et al.**, 2005 ; **Matasyoh et al.**, 2007). Selon **Dorman et Deans**, (2000), les huiles essentielles contenant des terpènes possèdent également une activité

antimicrobienne. Certaines études ont démontré que les huiles essentielles ont généralement une activité antibactérienne plus élevée que les mélanges de leurs principaux composants, suggérant ainsi que les composants mineurs sont essentiels à l'activité synergique (**Marino et al.**, 2001 ; **Bassolé et al.**, 2012). La synergie entre les composés des plantes aromatiques joue souvent un rôle essentiel dans l'efficacité et la réduction de la résistance au développement de tout micro-organisme pathogène (**Elshafie et al.**, 2017). Par conséquent, l'activité antimicrobienne pourrait être également attribuée à la présence modérée des monoterpènes oxygénés (carvacrol, thymol, 4-terpinenol, α -terpinéol), qui ont une activité inhibitrice à large spectre (**Carson et Riley** 1995 ; **Kordali et al.**, 2007 ; **Li et al.**, 2014 ; **Magi et al.**, 2015 ; **Du et al.**, 2015). Il semble que le p-cymène (0.8%) qui possède un très faible effet antimicrobien, pourrait induire un gonflement de la membrane cellulaire bactérienne. Grâce à ce mécanisme, le p-cymène permet probablement de transporter plus facilement d'autres composés bioactifs dans la cellule, de sorte qu'un effet synergique est obtenu lorsque ces composés sont utilisés ensemble (**Ultee et al.**, 2002).

Cette étude nous a permis de conclure que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* expriment une activité antibactérienne intéressante, en particulier contre *Staphylococcus aureus*. Toutefois, nous remarquons que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est moins active comparée à celle de *Teucrium polium*, sauf vis-à-vis d'*E. coli*.

2.6.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits testés

Plusieurs chercheurs ont étudié l'efficacité des extraits de plantes et de leurs composants actifs en tant qu'agents antimicrobiens afin de contrôler la croissance des micro-organismes responsables de l'altération des aliments (**Mostafa et al.**, 2017).

➤ Cas de la menthe pouliot

Les résultats des mesures du diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'huile essentielle et des extraits de la menthe pouliot sur les souches testés sont indiqués sur la Figure 42.

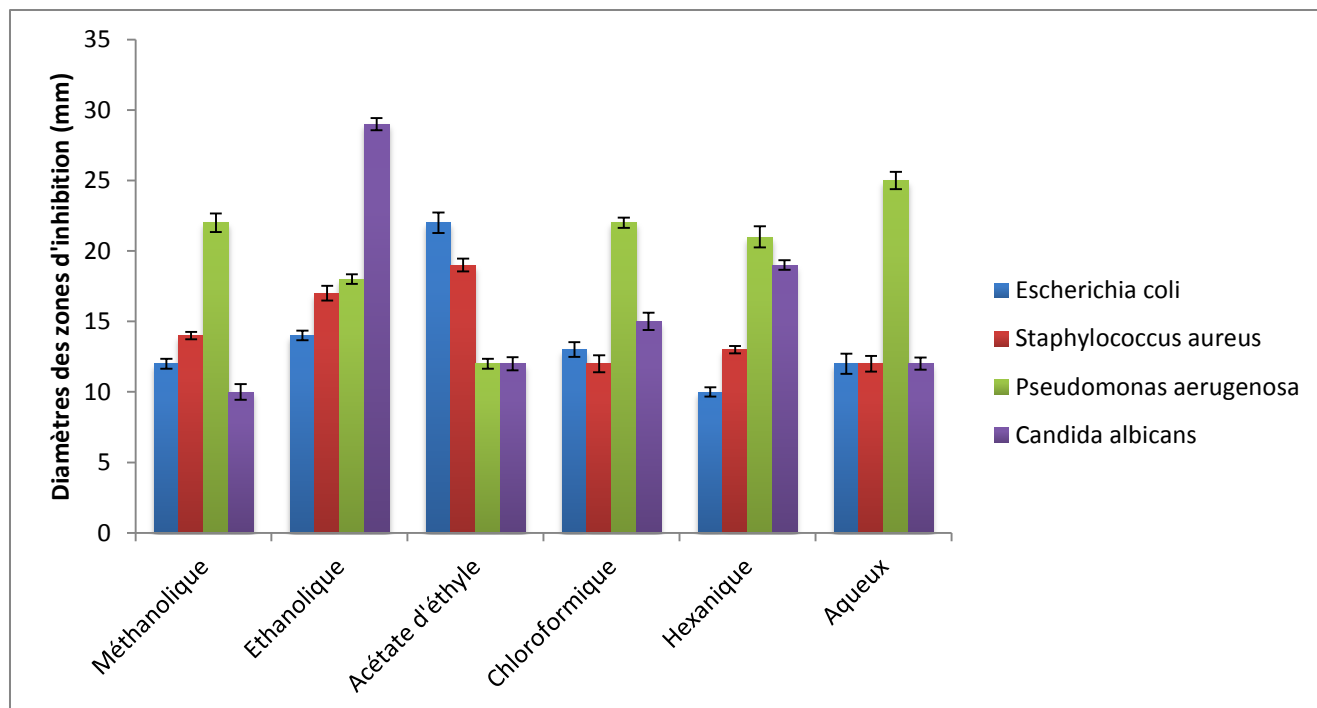


Figure 42 : Zones d'inhibition des souches testées produites par les différents extraits de *Mentha pulegium*.

Les résultats obtenus à partir des aromagrammes montrent que tous les extraits non volatils de *Mentha pulegium* présentent un effet antimicrobien contre toutes les souches testées, avec des diamètres d'inhibition qui varient de 10 ± 0.34 à 29 ± 0.43 mm. Les zones d'inhibition obtenues lors de l'analyse qualitative des différents extraits de la menthe pouliot sont illustrées sur les Figures 8 et 9, (annexe). Nous constatons que l'extrait méthanolique exerce une inhibition modérée sur *Pseudomonas aeruginosa* et faible sur *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Concernant l'extrait éthanolique, nous remarquons qu'il présente un effet antifongique considérable contre *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 29 ± 0.43 mm. Toutefois, son action est modérée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et légère contre *E. coli*. En ce qui concerne l'extrait d'acétate d'éthyle nous constatons qu'il possède une activité inhibitrice modérée vis-à-vis d'*E. coli* et *Staphylococcus aureus* et une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Dans le cas de l'extrait chloroformique, nous remarquons qu'il présente une activité fortement inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et légèrement inhibitrice contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Quant à l'extrait hexanique, il indique une activité inhibitrice modérée contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* et une faible activité vis-à-vis d'*E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Finalement, l'extrait aqueux présente une inhibition

modérée sur *Pseudomonas aeruginosa* et une faible inhibition sur *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Ces résultats révèlent que parmi tous les extraits testés, l'extrait d'acétate d'éthyle s'est avéré être le plus actif contre *E. coli* (22 ± 0.72 mm) et *Staphylococcus aureus* (19 ± 0.45 mm). L'extrait aqueux et l'extrait éthanolique sont respectivement les plus actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* (25 ± 0.61 mm) et *Candida albicans* (29 ± 0.43 mm).

L'efficacité antimicrobienne des extraits de plantes peut être affectée par la structure chimique des composants actifs et leur concentration, la nature du solvant d'extraction ainsi que l'origine géographique de la plante (**Mudzengi et al.**, 2017). De nombreuses études ont mis en évidence les activités antibactériennes et antifongiques de certains extraits de *Mentha pulegium*. Dans l'étude de **Stanojkovic et al.** (2008), l'activité antibactérienne des extraits aqueux, éthanolique et d'acétate d'éthyle obtenus à partir des parties aériennes de *Mentha pulegium* a été déterminée contre *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pectobacterium carotovorum*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, il a été rapporté que les extraits aqueux et éthanolique de *Mentha pulegium* sont plus actifs que son extrait d'acétate d'éthyle. **Motamedi et al.**, (2014) ont signalé que les extraits éthanolique et méthanolique de *Mentha pulegium* d'Iran présentent une activité antibactérienne significative contre les bactéries Gram positif (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*). L'effet maximal a été observé pour toutes les concentrations des extraits éthanolique et méthanolique sur *Proteus mirabilis* (25 mm), tandis que le plus faible effet a été enregistré pour *Pseudomonas aeruginosa*. Selon **Aycan et al.**, (2015), l'extrait méthanolique des feuilles de la menthe pouliot de Turquie présente un faible effet inhibiteur sur *E. coli* (10 mm) et *Staphylococcus aureus* (16 mm) comparé à son extrait acétonique. **Ceyhan-Güvensen et Keskin**, (2016) ont étudié les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de la menthe pouliot de Turquie. L'extrait méthanolique présente la plus forte activité inhibitrice contre *E. coli* (13 ± 0.1 mm), *Staphylococcus aureus* (20 ± 0.1 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (16 ± 0.11 mm). Toutefois, l'extrait éthanolique a montré une inhibition significative contre *Candida albicans* (15 ± 0.02 mm).

L'activité antimicrobienne mise en évidence contre toutes les souches microbiennes testées pourrait être attribuée à la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans les différents extraits de la menthe pouliot. Certains chercheurs ont suggéré que les composants antimicrobiens des extraits de plantes (composés phénoliques) peuvent interagir avec les enzymes et les protéines de la membrane cellulaire microbienne provoquant sa perturbation

pour disperser un flux de protons vers l'extérieur cellulaire, ce qui induit la mort cellulaire ou l'inhibition des enzymes nécessaires pour la biosynthèse des acides aminés (Tsuchiya et al., 1996 ; Burt, 2004, Gill et Holley, 2006). D'autres auteurs attribuent l'effet inhibiteur de ces extraits de plantes aux caractères hydrophobes de ces derniers qui leur permettent de réagir avec les protéines de la membrane cellulaire microbienne et des mitochondries, ce qui perturbent leurs structures et changent leur perméabilité (Friedman et al., 2004, Tiwari et al. 2009). Les fonctions critiques de la membrane régulant l'échange des cellules et la synthèse des métabolites sont également affectées par ces altérations. Par conséquent, l'effet cellulaire multiniveau des composés phénoliques peut bloquer l'activité bactérienne. Tassou et al., (2000) ont noté une perte du matériel intracellulaire provenant d'*E. coli* et de *Staphylococcus aureus* qui était liée à la concentration en polyphénols.

➤ Germandrée tomenteuse

Les résultats des mesures du diamètre des zones d'inhibition (mm) des extraits de la germandrée sur les souches testés sont illustrés sur la Figure 43.

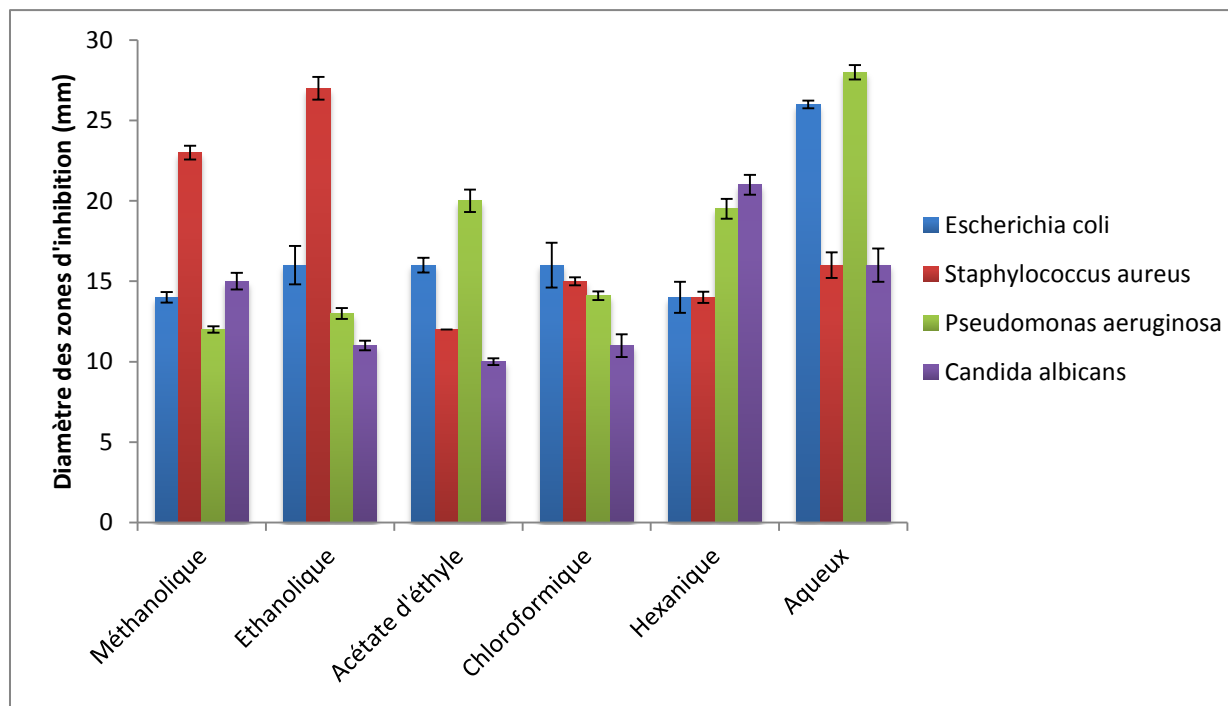


Figure 43 : Zones d'inhibition sur toutes les souches testées produites par les différents extraits de *Teucrium polium*.

D'après les résultats de la Figure 43, nous remarquons que tous les extraits de la germandrée se sont révélés actifs vis-à-vis des souches testées mais à des degrés différents. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient de 10 ± 0.2 à 28 ± 0.45 mm en fonction des extraits examinés et des souches microbiennes testées. Les zones d'inhibition obtenues lors de l'analyse qualitative des différents extraits de la germandrée sont représentées sur les Figures 8 et 9, (annexe). L'extrait méthanolique possède une activité modérément inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et légèrement inhibitrice sur *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Pour l'extrait éthanolique, nous constatons qu'il présente une activité inhibitrice modérée contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* et une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. L'extrait d'acétate d'éthyle exerce une inhibition modérée sur *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et légère sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Concernant l'extrait chloroformique, nous remarquons qu'il présente une activité inhibitrice modérée contre *E. coli* et faible vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. L'extrait hexanique montre une inhibition modérée contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* et légère dans le cas d'*E. coli* et de *Staphylococcus aureus*. Finalement, nous constatons que l'extrait aqueux présente une inhibition remarquable vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 28 ± 0.45 mm. Toutefois, son inhibition est modérée contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'extrait aqueux est le plus actif sur *E. coli* (26 ± 1.24 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (28 ± 0.45 mm). Par contre, les extraits éthanolique et hexanique se sont avérés être respectivement les plus actifs vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (27 ± 0.71 mm) et *Candida albicans* (21 ± 0.61 mm).

Dans la littérature, plusieurs auteurs ont rapporté les activités antibactériennes et antifongiques de quelques extraits non volatils de la germandrée. Selon les résultats obtenus par **Abulla** et al., (2009), les extraits éthanolique et hexanique de *Teucrium polium* d'Irak ont présenté une activité antimicrobienne contre tous les micro-organismes testés avec des diamètres d'inhibition qui variaient de 13 à 24 mm. Toutefois, les extraits hexanique et éthanolique ont respectivement montré la plus forte inhibition contre *E. coli* (23 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (24 mm). Selon **Dridi** et al., (2016), l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* de l'est d'Algérie montre une activité inhibitrice sur *E. coli* (16 mm), *Staphylococcus aureus* (11.5 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (19 mm). **Masomi** et **Hassanshahian** (2016), ont rapporté que l'activité antifongique de l'extrait méthanolique (15 ± 0.3 mm) de *Teucrium polium* d'Iran est meilleure que celle de l'extrait éthanolique (11

± 0.9 mm) sur *Candida albicans*. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus dans notre étude. **Ben Othman** et *al.*, (2017) ont indiqué que les extraits éthanolique et aqueux obtenus à partir de la germandrée Tunisienne présentent une activité inhibitrice contre les bactéries Gram négatif et Gram positif à différents niveaux. *Pseudomonas aeruginosa* y était la plus résistante (9-13 mm), alors que *Staphylococcus aureus* (10-17 mm) y était la plus sensible.

Nos résultats montrent des activités antimicrobiennes intéressantes pour les différents extraits de *Teucrium polium*. Cette efficacité serait probablement liée à la présence des polyphénols dans les extraits testés, qui sont connus pour leurs effets antibactériens (**Maddox** et *al.*, 2010).

2.6.2. Etude quantitative des huiles essentielles et des extraits

Afin de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles et des extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) ainsi que le rapport CMB/CMI ont été déterminées. Lorsque le rapport d'activité CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4), cette dernière est qualifiée de substance bactéricide et si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique (**Marmonier**, 1990).

2.6.2.1. Détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles examinées

Les valeurs de la CMI, de la CMB et du rapport CMB/CMI des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sont présentées dans le Tableau 21. Les résultats obtenus lors de la détermination de la CMI des deux huiles essentielles examinées sont illustrée sur les Figures 10 et 11, (annexe).

Tableau 21 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*.

| Huiles essentielles | Valeurs | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <i>Mentha pulegium</i> | CMI % | 0.03 | 0.03 | 2 | 0.5 |
| | CMB % | 2 | 2 | > 2 | > 2 |
| | CMB/CMI | 6.66 | 6.66 | - | - |
| <i>Teucrium polium</i> | CMI % | 0.06 | 0.06 | 1 | 1 |
| | CMB % | 0.12 | 2 | 2 | > 2 |
| | CMB/CMI | 2 | 16.66 | 2 | - |

D'après les résultats décrits sur le Tableau 21, nous remarquons que les valeurs des CMI et des CMB obtenues varient en fonction des huiles essentielles utilisées et des souches microbiennes testées. L'huile essentielle de *Mentha pulegium* montre une forte inhibition avec des valeurs de CMI plutôt faibles (0.03% pour *E. coli* et *Staphylococcus aureus* et 0.5 % pour la levure), sauf vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (CMI de 2%). Par conséquent, nous pouvons dire que *Pseudomonas aeruginosa* est la souche bactérienne la plus résistante à cette essence. Par ailleurs, nous pouvons noter l'existence d'une cohérence entre les valeurs de la CMI et ceux des diamètres d'inhibition obtenus avec la méthode de l'aromatogramme. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Mahboubi** et **Haghi** (2008) et **Abdelli** et *al.*, (2016), qui ont montré une activité antibactérienne efficace de l'essence de la menthe pouliot, avec de faibles valeurs de la CMI et de la CMB. Cependant, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Cherrat** et *al.*, (2014), qui ont trouvés des CMI et des CMB de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* plus élevées pour *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. En se basant sur les valeurs du rapport CMB/CMI, nous pouvons dire que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* exerce un effet bactériostatique contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (CMB/CMI > 4). Ces résultats sont similaires à ceux rapporté par **Bouyahya** et *al.*, (2017).

Par ailleurs, l'huile essentielle de la germandrée présente une activité antimicrobienne modérée vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* à travers des valeurs

moyennes de la CMI (1 %). Notons également qu'*E. coli* et *Staphylococcus aureus* se sont avérées être les souches les plus sensibles sous l'action de l'huile essentielle de *Teucrium polium* avec des valeurs très faibles de la CMI (0.06 %), ce qui confirme les résultats précédemment obtenus lors de l'étude qualitative. Ces résultats sont supérieurs à ceux indiqués par **Belmekki** et al., 2013, qui ont obtenu des valeurs de CMI plus élevées pour *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. D'après les valeurs du rapport CMB/CMI, nous pouvons déduire que l'huile essentielle de la germandrée possède un effet bactéricide contre *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (CMB/CMI \leq 4) et bactériostatique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (CMB/CMI $>$ 4).

2.6.2.2. Détermination de la CMI et de la CMB des extraits examinés

➤ Cas de la menthe pouliot

Les valeurs de la CMI et de la CMB ainsi que celles du rapport CMB/CMI des différents extraits examinés de *Mentha pulegium* sont résumées dans le Tableau 22. Les CMI obtenues lors de l'analyse quantitative des différents extraits de la menthe pouliot sont illustrées par les Figures 12 et 13, (annexe).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que tous les extraits de la menthe pouliot testés présentent un pouvoir antimicrobien moyen voire faible pour certaines souches, avec des CMI qui varient de 0.5 à 2 %. Notant également que les valeurs des CMI et des CMB trouvées varient en fonction des extraits examinés et des souches testées. En se basant sur les valeurs du rapport CMB/CMI, nous remarquons que les extraits hexanique et aqueux exercent un effet bactéricide contre *E. coli*. De plus, les extraits d'acétate d'éthyle, chloroformique, hexanique et aqueux possèdent un pouvoir bactéricide sur *Pseudomonas aeruginosa*. Par ailleurs, les extraits éthanolique, d'acétate d'éthyle, chloroformique, hexanique et aqueux semblent avoir une action fongicide contre *Candida albicans* (CMB/CMI = 1).

Tableau 22 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différents extraits de *Mentha pulegium*.

| Extraits de <i>Mentha pulegium</i> | Valeurs | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------------------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Extrait méthanolique | CMI % | 2 | 0.5 | 2 | 0.5 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | > 2 | 2 |
| | CMB/CMI | - | - | - | 4 |
| Extrait éthanolique | CMI % | 2 | 2 | > 2 | 0.5 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | - | 0.5 |
| | CMB/CMI | - | - | - | 1 |
| Extrait d'acétate d'éthyle | CMI % | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | 2 | 2 |
| | CMB/CMI | - | - | 2 | 2 |
| Extrait chloroformique | CMI % | 1 | 1 | 2 | 1 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | 2 | 1 |
| | CMB/CMI | - | - | 1 | 1 |
| Extrait hexanique | CMI % | 1 | 1 | 1 | 0.5 |
| | CMB % | 1 | > 2 | 1 | 1 |
| | CMB/CMI | 1 | - | 1 | 2 |
| Extrait aqueux | CMI % | 1 | 2 | 1 | 1 |
| | CMB % | 1 | > 2 | 1 | 1 |

| | | | | |
|---------|---|---|---|---|
| CMB/CMI | 1 | - | 1 | 1 |
|---------|---|---|---|---|

➤ **Germandrée tomenteuse**

Les valeurs de la CMI, de la CMB et du rapport CMB/CMI des différents extraits testés de *Teucrium polium* sont consignées dans le Tableau 23. Les CMI obtenues lors de l'étude quantitative des différents extraits de la germandrée sont illustrées par les Figures 14 et 15, (annexe).

Les différents extraits non volatils obtenus à partir de *Teucrium polium* montrent des activités inhibitrices moyennes voir faibles pour certain micro-organismes testés, avec des valeurs de CMI qui varient entre 0.5 et 2 %. En se basant sur les valeurs du rapport d'activité CMB/CMI, nous pouvons dire que les extraits éthanolique, chloroformique, hexanique et aqueux semblent avoir un effet bactéricide contre *E. coli* (CMB/CMI \leq 4). Les extraits éthanolique, hexanique et aqueux présentent une action bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. De plus, les extraits chloroformique, hexanique et aqueux possèdent un effet bactéricide contre *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres part, les extraits méthanolique, chloroformique et aqueux semble exercer une action fongicide contre *Candida albicans* (CMB/CMI = 1).

Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différents extraits de *Teucrium polium*.

| Extraits de <i>Teucrium polium</i> | Valeurs | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------------------------|---------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Extrait méthanolique | CMI % | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | > 2 | 1 |
| | CMB/CMI | - | - | - | 1 |
| Extrait éthanolique | CMI % | 2 | 2 | > 2 | 0.5 |
| | CMB % | 2 | 2 | - | > 2 |
| | CMB/CMI | 2 | 2 | - | - |
| Extrait d'acétate d'éthyle | CMI % | 1 | 0.5 | 0.5 | 1 |
| | CMB % | > 2 | > 2 | 2 | > 2 |
| | CMB/CMI | - | - | 4 | - |
| Extrait chloroformique | CMI % | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | CMB % | 1 | > 2 | 1 | 1 |
| | CMB/CMI | 1 | - | 1 | 1 |
| Extrait hexanique | CMI % | 0.5 | 0.5 | 1 | 0.5 |
| | CMB % | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | CMB/CMI | 2 | 4 | 1 | 4 |
| Extrait aqueux | CMI % | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | CMB % | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | |
|---------|---|---|---|---|
| CMB/CMI | 1 | 1 | 1 | 1 |
|---------|---|---|---|---|

2.7. Evaluation de l'activité insecticide

Dans de nombreuses régions du monde, les plantes disponibles localement sont largement utilisées pour protéger les denrées stockées contre les dommages causés par les insectes ravageurs (Nikpay, 2006 ; Akhtar et al., 2008 ; Tripathi et al., 2009 ; Khater, 2012). *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae) est l'un des insectes ravageurs les plus importants des graines de pois chiche stockées dans le monde (Loni et Panahi, 2014). Au cours de l'entreposage, les adultes pondent leurs œufs sur les graines; les larves se nourrissant des cotylédons provoquent des pertes quantitatives et qualitatives considérables (Jackai et Daoust, 1986 ; Ogunwolu et Odunlami, 1996 ; Pascual-Villalobos et Ballesta-Acosta, 2003).

Il y a eu récemment un intérêt accru pour l'utilisation des huiles essentielles et des extraits de plantes dans la protection des denrées entreposées contre ces déprédateurs. Les substances dérivées de plantes sont plus facilement biodégradables, moins susceptibles de contaminer l'environnement et peuvent être moins toxiques pour les mammifères (Rajashekar et al., 2012). Dans ce contexte, les essences et les extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sont testés pour leur potentielle activité insecticide à l'égard des adultes de *C. maculatus*. Cette étude est réalisée à travers l'évaluation de la mortalité de ces insectes exposés aux différentes doses d'huiles essentielles (par effet contact et inhalation) et d'extraits (par effet contact) et la détermination des doses sublétales et létales (DL₃₀, DL₅₀ et DL₉₀). L'impact des essences de la menthe pouliot et la germandrée sur la reproduction des bruches (fécondité, éclosion des œufs et émergence des adultes) est également étudié.

2.7.1. Test de la toxicité des huiles essentielles sur les adultes de *Callosobruchus maculatus* par contact

➤ Cas de la menthe pouliot

L'effet de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur la longévité des adultes de *C. maculatus* lors du test de toxicité par contact est représenté sur la Figure 44.

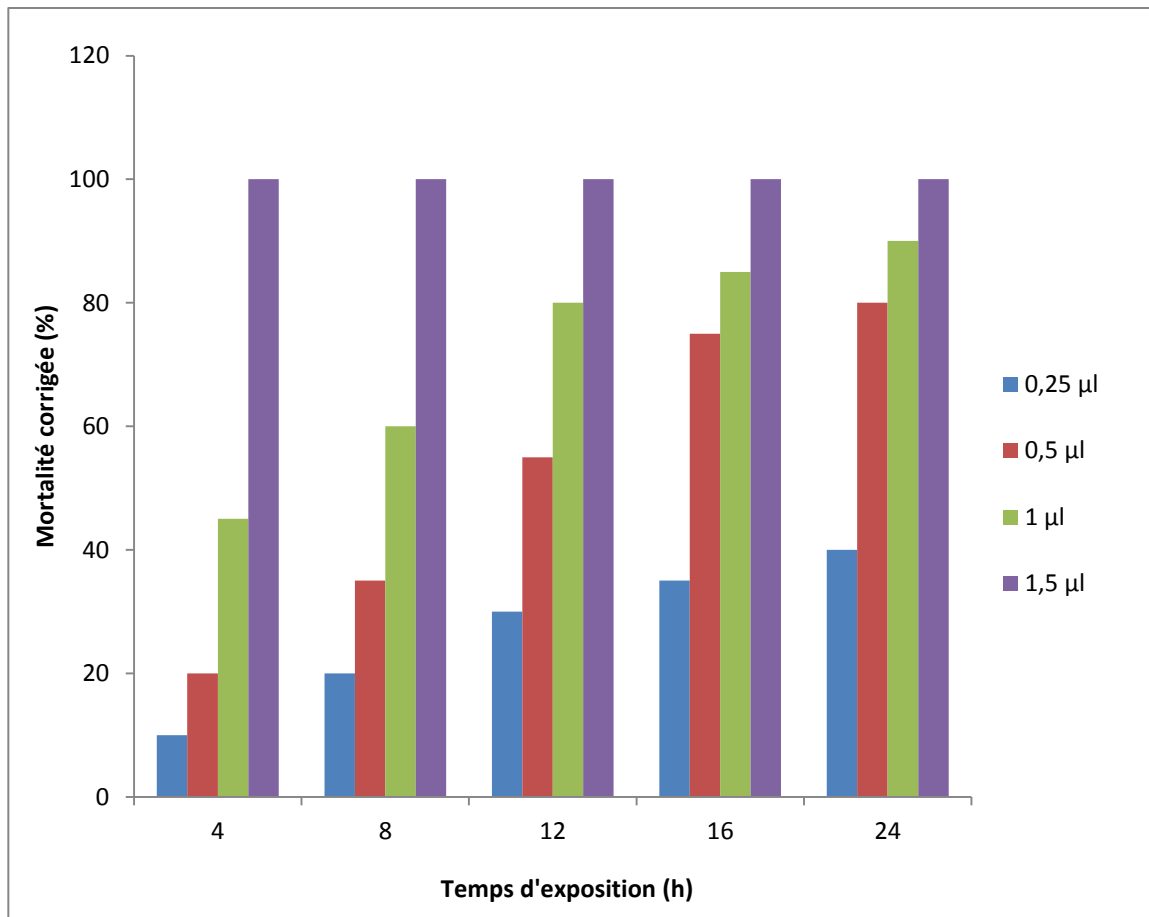


Figure 44 : Évolution du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses d'huile essentielle de *Mentha pulegium* par contact.

D'après les résultats décrits sur la Figure 44, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* semble avoir affectée la longévité des adultes de *C. maculatus* d'une manière très efficace. L'effet insecticide de l'huile essentielle de la menthe pouliot n'a pas nécessité beaucoup de temps pour se manifester. En effet, la mortalité maximale des bruches (100%) est enregistrée au bout des quatre premières heures post traitement avec la plus forte dose testée ($0.023 \mu\text{l}/\text{cm}^2$). Par conséquent, nous pouvons dire que l'essence de la menthe pouliot utilisée à cette dose a occasionné un effet de choc rapide sur les adultes de *C. maculatus*. Toutefois, aucune mortalité n'est observée dans le lot témoin pendant toute la durée d'exposition. Par ailleurs, à la dose de $0.25 \mu\text{l}$ ($0.004 \mu\text{l}/\text{cm}^2$), la mortalité corrigée des bruches est de 10 et 40%, respectivement après 4 et 24h d'exposition. Ces résultats obtenus montrent que cette mortalité corrigée augmente proportionnellement avec l'augmentation de la dose de l'essence utilisée et du temps d'exposition.

Afin de calculer les doses sublétales et létales provoquant la réduction de la population des insectes de 30, 50 et 90 % (DL₃₀, DL₅₀ et DL₉₀), des courbes de régression des mortalités exprimées en Probit en fonction du logarithme des doses sont réalisées. Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 45.

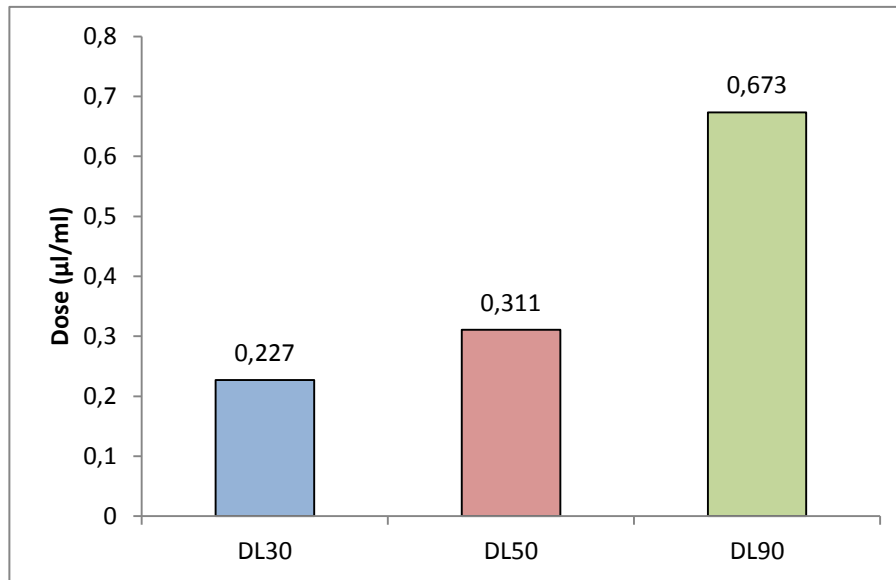


Figure 45 : Doses sublétales et létales de l'huile essentielle de la menthe pouliot.

La faible valeur de la DL₅₀ (0.311 µl/ml), calculée après 24 h d'exposition, confirme la toxicité élevée de l'essence de la menthe pouliot vis-à-vis des adultes de *C. maculatus* par contact. Les effets toxiques liés à cette essence se sont manifestés dès l'introduction des insectes dans les boîtes de pétri. En effet, nous avons observé une hyperactivité, suivie d'un état comateux conduisant à la mort rapide de ces insectes.

Des études antérieures ont rapporté la toxicité de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur *C. maculatus* et d'autres ravageurs des denrées stockées. Dans ce contexte, **Mahmoudvand et al.** (2011) ont signalé que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* exerce une toxicité aigüe sur les adultes de *Sitophilus granarius* avec une DL₅₀ très faible (0.038µl/l d'air) après 24 h d'exposition. **Benayad et al.**, (2011) ont rapporté que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* s'est révélée très toxique vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* et *Rhyzopertha dominica*. Le pourcentage de mortalité des deux coléoptères était de 100% pour une dose de 3 µl au bout des 24 premières heures. **Esmaili et al.**, (2013) ont rapporté que l'huile essentielle de la menthe pouliot possède un fort potentiel insecticide sur les adultes de *C. maculatus*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricornis* et *Sitophilus oryzae*. **Barros et al.**, (2015) ont montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* exerce un effet insecticide considérable contre les

adultes de *Sitophilus zeamais*. En effet, cette essence a causé une mortalité de 100% de *S. zeamais* après 24 h d'exposition à la plus faible dose utilisée (0.159 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

L'efficacité de l'huile essentielle de la menthe pouliot peut être attribuée à sa composition chimique et plus particulièrement aux monoterpènes qui agissent comme des agents insecticides (**Abdelgaleil et al.**, 2009). En effet, l'essence de la menthe pouliot est caractérisée par la présence majoritaire des cétones monoterpéniques (86.3%), dont l'isomenthone (37.1%), la pulégone (34.8%) et la menthone (10.4%). Ces composés actifs ont montré une activité insecticide importante contre plusieurs ravageurs des denrées stockées (**Mason**, 1990 ; **Lee et al.**, 2003 ; **Azziz et Abbass**, 2010 ; **Zekri et al.**, 2013 ; **Ajayi et al.**, 2014 ; **Salem et al.**, 2018). Néanmoins, il a également été démontré que des composés mineurs peuvent contribuer à l'activité insecticide (**Iacobellis et al.**, 2005 ; **Ngamo et al.**, 2007 ; **Ndomo et al.**, 2009).

La toxicité des huiles essentielles et de leurs constituants chez les insectes révèle une action neurotoxique provoquant une hyperactivité, une hyperextension des jambes et de l'abdomen et un effet *knock-down* ou d'immobilisation rapide (**Prowse et al.**, 2006 ; **Mann et al.**, 2011 ; **Zhao et al.**, 2013). En effet, les huiles essentielles exercent leur bioactivité en interagissant avec diverses cibles du système nerveux, y compris les récepteurs tyramine et octopamine (**Enan**, 2001 ; **Kostyukovsky et al.**, 2002 ; **Enan**, 2005 a, b ; **Price et Berry**, 2006), les récepteurs GABA ionotropes (**Priestley et al.**, 2003, **Tong et Coats**, 2010), l'acétylcholinestérase (**Grundy et Still** 1985; **Ryan et Byrne** 1988 ; **Keane et Ryan** 1999 ; **Abdelgaleil et al.**, 2009 ; **López et Pascual-Villalobos**, 2010) et le cytochrome P450 monooxygénase (**De-Oliveira et al.**, 1997).

➤ Cas de la germandrée tomenteuse

Les résultats du test de toxicité de l'huile essentielle de *Teucrium polium* par contact sont illustrés sur la Figure 46. L'essence de *Teucrium polium* semble exercée un effet toxique vis-à-vis des bruches lors du test par contact. Nous remarquons que le taux de mortalité croît avec la dose de l'huile essentielle testée et le temps d'exposition. Notons qu'aucune mortalité n'est enregistrée dans le lot témoin pendant toute la durée d'exposition. Par ailleurs, au bout de 24h d'exposition, la mortalité des adultes de *C. maculatus* atteint les 60% pour la plus forte dose (0.9435 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

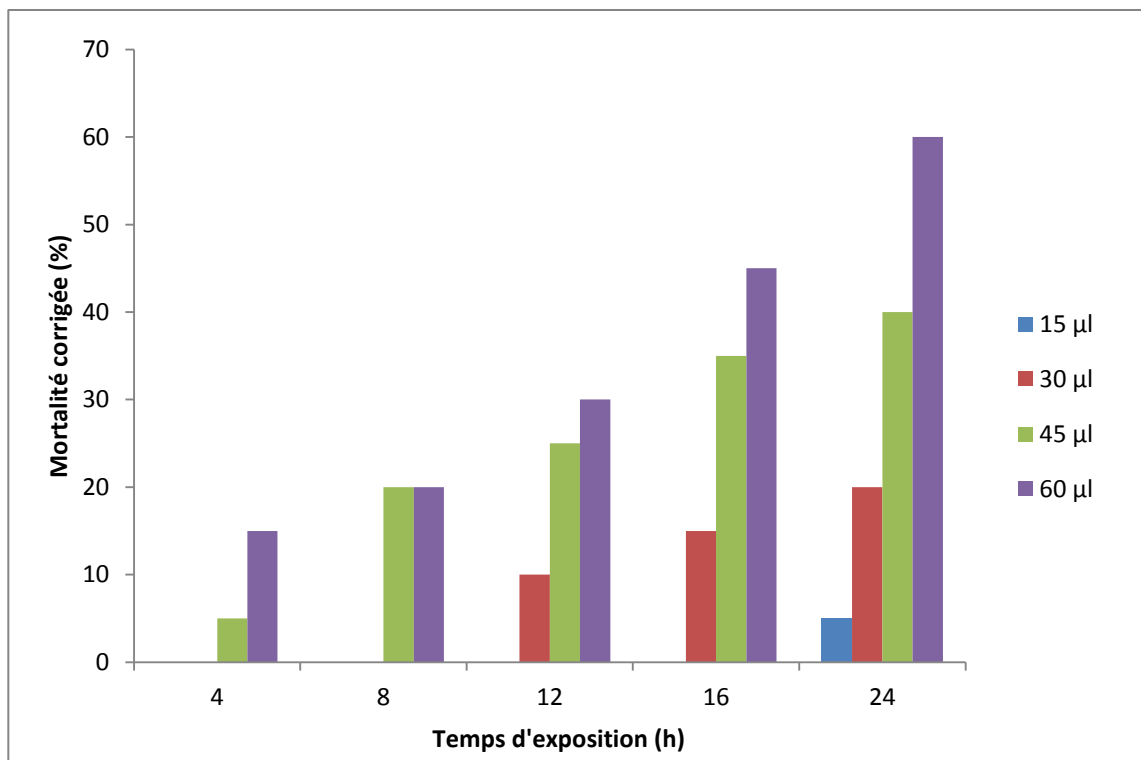


Figure 46 : Évolution du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses d'huile essentielle de *Teucrium polium* par contact.

Les doses sublétales et létales de l'huile essentielle de la germandrée calculées après 24 h vis-à-vis des adultes de *C. maculatus* lors du test de toxicité par contact sont représentées sur la Figure 47. D'après les résultats de l'analyse des Probits, nous remarquons que l'huile essentielle de *Teucrium polium* (DL_{50} de 52.64 µl/ml) exerce un effet toxique moins efficace vis-à-vis des bruches que celui de l'essence de *Mentha pulegium* (DL_{50} de 0.311 µl/ml). Par conséquent, nous pouvons dire que les adultes de *C. maculatus* sont moins sensibles à l'action de l'huile essentielle de la germandrée.

La composition chimique des huiles essentielles est généralement caractérisée par la présence des composés terpéniques qui peuvent varier et affecter leur activité biologique. L'huile essentielle de *Teucrium polium* est constituée principalement de sesquiterpènes (55.8%). En générale, les huiles essentielles contenant des sesquiterpènes sont moins volatiles que celles contenant des monoterpènes car leurs constituants ont des pressions de vapeur plus faibles (Tingey et al., 1980 ; Fichan et al., 1999). Ceci pourrait expliquer la faible activité de l'huile essentielle de *Teucrium polium* à l'égard des adultes de *C. maculatus* comparée à celle de *Mentha pulegium*.

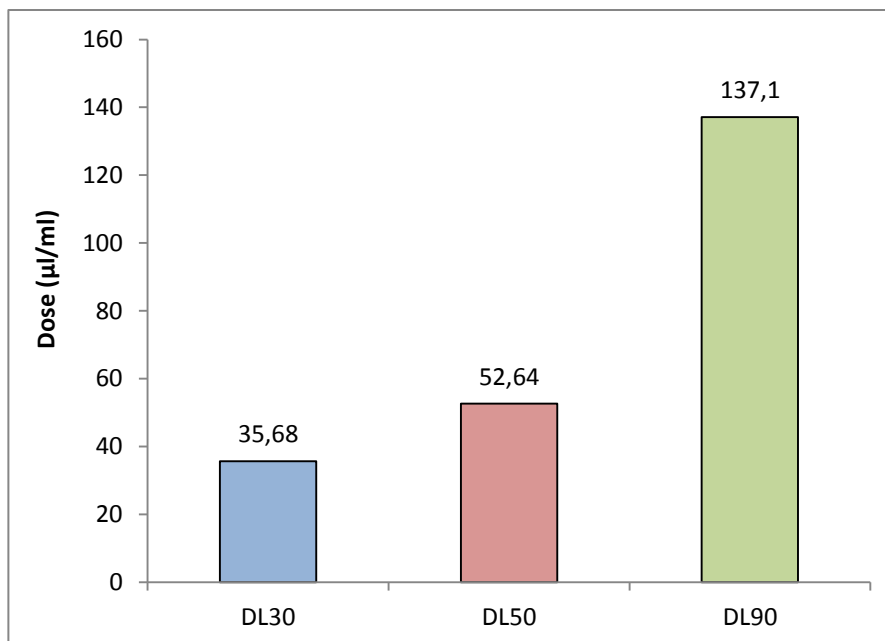


Figure 47 : Doses sublétales et létales de l'huile essentielle de la germandrée.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Teucrium polium* contre certains ravageurs des denrées stockées. Selon **Nabavi et al.**, (2009), l'huile essentielle de la germandrée possède une activité adulticide vis-à-vis de *C. maculatus* (IC_{50} de 9.6 µl/l) et *Tribolium confusum* (IC_{50} de 35.5 µl/l). **Heydarzade et Moravvej**, (2012) ont rapporté que l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Teucrium polium* d'Iran possède une activité insecticide contre les adultes mâles et femelles de *C. maculatus*. **Khani et Heydarian**, (2014) ont indiqué que l'huile essentielle de *Teucrium polium* est toxique à l'égard des adultes de *C. maculatus* et *Tribolium castaneum*.

2.7.2. Evaluation de la toxicité des différents extraits testés sur les adultes de *Callosobruchus maculatus* par contact

➤ Cas de la menthe pouliot

Depuis très longtemps, les extraits de plantes ont été utilisés comme protecteurs naturels des grains stockés contre les insectes ravageurs (**Rajashekar et al.**, 2012). *Mentha pulegium* a été principalement utilisée comme insecticide sous forme de son huile essentielle, toutefois, ses extraits non volatils ont également montré quelques propriétés insecticides.

L'effet des différents extraits de la menthe pouliot sur la longévité des adultes de *C. maculatus* lors du test de toxicité par contact est représenté dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Évolution de la mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses d'extraits de *Mentha pulegium* par contact.

| Extraits <i>Mentha</i> <i>pulegium</i> | de | Doses (mg/ml) | Doses (mg/cm ²) | Mortalité corrigée (%) | | | | |
|--|----|------------------|--------------------------------|------------------------|------|------|------|------|
| | | | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h | 72 h |
| Extrait méthanolique | | 6 | 0.094 | 20 | 20 | 30 | 40 | 45 |
| | | 12 | 0.189 | 20 | 30 | 45 | 60 | 65 |
| | | 24 | 0.378 | 25 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| | | 48 | 0.755 | 40 | 60 | 70 | 80 | 100 |
| Extrait éthanolique | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 5 | 15 | 25 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 5 | 10 | 20 | 45 |
| | | 24 | 0.378 | 0 | 20 | 20 | 40 | 60 |
| | | 48 | 0.755 | 20 | 25 | 40 | 55 | 80 |
| Extrait d'acétate d'éthyle | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 5 | 15 | 20 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 5 | 15 | 20 | 40 |
| | | 24 | 0.378 | 5 | 15 | 20 | 25 | 45 |
| | | 48 | 0.755 | 10 | 25 | 40 | 45 | 60 |
| Extrait chloroformique | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 10 | 20 | 20 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 5 | 15 | 20 | 30 |
| | | 24 | 0.378 | 0 | 10 | 20 | 30 | 45 |
| | | 48 | 0.755 | 10 | 15 | 25 | 50 | 65 |
| Extrait hexanique | | 6 | 0.094 | 0 | 0. | 0 | 5 | 10 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 5 | 15 | 20 | 25 |
| | | 24 | 0.378 | 0 | 10 | 20 | 35 | 40 |
| | | 48 | 0.755 | 20 | 30 | 35 | 40 | 60 |
| Extrait aqueux | | 6 | 0.094 | 0 | 5 | 15 | 30 | 30 |
| | | 12 | 0.189 | 15 | 20 | 30 | 35 | 40 |
| | | 24 | 0.378 | 35 | 40 | 45 | 55 | 60 |
| | | 48 | 0.755 | 40 | 45 | 50 | 65 | 80 |
| Témoin | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Les résultats de l'évaluation de la toxicité par contact révèlent que tous les extraits de la menthe pouliot présentent un effet insecticide variable contre les adultes de *C. maculatus*. Nous remarquons que pour tous les extraits testés, la mortalité corrigée augmente avec l'augmentation de la dose et du temps d'exposition. Notons par ailleurs, qu'aucune mortalité n'est enregistrée dans le lot témoin.

Les valeurs des DL_{50} calculées après une durée de 72 h confirment la sensibilité des bruches vis-à-vis des différents extraits utilisés (Figure 48). Par conséquent, la toxicité des extraits de la menthe pouliot peut être classée dans l'ordre suivant : extrait méthanolique > aqueux > éthanolique > chloroformique > acétate d'éthyle > hexanique. D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique s'est avéré être le plus efficace pour la réduction de l'effectif vivant des bruches. En effet, la mortalité totale des insectes est atteinte au bout de 72 h d'exposition et ceci pour la plus forte dose utilisée (0.755 mg/cm^2).

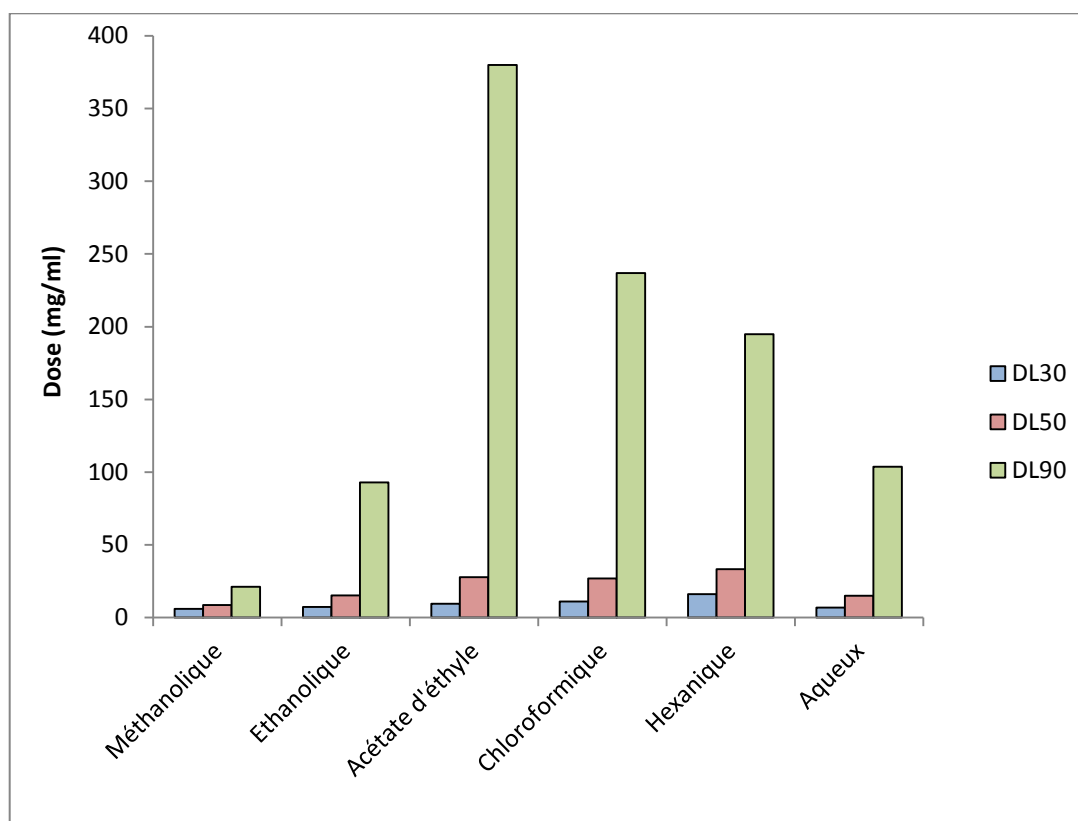


Figure 48 : Doses sublétales et létales des extraits de *Mentha pulegium*.

L'efficacité des extraits de plantes en tant qu'insecticides dépend du solvant utilisé pour leur extraction (Khan et al., 2017). La différence dans l'activité insecticide entre les extraits testés peut être attribuée à la polarité du solvant, qui va du très polaire (aqueux, méthanol,

éthanol), au moyennement polaire (acétate d'éthyle et chloroforme) jusqu'à l'apolaire (hexane). Nous pouvons toutefois noter que les extraits méthanolique, aqueux et éthanologique des parties aériennes de la menthe pouliot montrent une forte activité insecticide contre les adultes de *C. maculatus*. Tandis que, les extraits chloroformique, acétate d'éthyle et hexanique exercent une activité modérée contre ces bruches.

La présence des composés phénoliques, connus pour leurs propriétés insecticides, dans les extraits examinés pourrait expliquer leur toxicité à l'égard des adultes de *C. maculatus* (Pavela, 2011 ; Donia et al., 2012 ; Alves et al., 2014). Ces composés provoquent des perturbations du comportement, de la croissance et du développement des insectes (War et al., 2012). La toxicité des polyphénols est corrélée positivement avec le pouvoir attractif des composés (Regnault-Roger et al., 2004).

➤ Cas de la germandrée tomenteuse

L'effet des différents extraits de la germandrée sur la longévité des adultes de *C. maculatus* lors du test de toxicité par contact est représenté dans le Tableau 25. Pour tous les extraits testés, la toxicité augmente en fonction de l'augmentation de la dose utilisée et du temps d'exposition. Aucune mortalité n'est enregistrée dans le lot témoin. D'après les résultats obtenus, tous les extraits de la germandrée manifestent une toxicité contre les adultes de *C. maculatus* relativement variable en fonction du solvant utilisé. Les doses sublétales et létales des extraits de *Teucrium polium* calculées après 72 h sont illustrées sur la Figure 49.

En se basant sur les valeurs des DL₅₀, l'efficacité des différents extraits de la germandrée décroît dans l'ordre suivant : extrait méthanolique > chloroformique > éthanologique > aqueux > acétate d'éthyle > hexanique. Notons que l'extrait méthanolique exerce le meilleur effet insecticide contre la bruche du pois chiche (DL₅₀ de 8.51 mg/ml) en raison de sa forte teneur en polyphénols. Nous remarquons également que les extraits chloroformique, éthanologique et aqueux des parties aériennes de la germandrée réduisent d'une façon très significative la longévité des adultes de *C. maculatus*. En effet, au bout de 72 h d'exposition, la plus forte dose des extraits aqueux, chloroformique et éthanologique (0.755 mg/cm²) a occasionnée respectivement des mortalités de 90, 85 et 80%. Toutefois, les extraits d'acétate d'éthyle et hexanique montrent une activité insecticide modérée contre les adultes de *C. maculatus*.

Tableau 25 : Évolution de la mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses d'extraits de *Teucrium polium* par contact.

| Extraits <i>Teucrium</i> <i>polium</i> | de | Doses (mg/ml) | Doses (mg/cm ²) | Mortalité corrigée (%) | | | | |
|--|----|------------------|--------------------------------|------------------------|------|------|------|------|
| | | | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h | 72 h |
| Extrait méthanolique | | 6 | 0.094 | 5 | 10 | 25 | 35 | 40 |
| | | 12 | 0.189 | 10 | 20 | 35 | 45 | 60 |
| | | 24 | 0.378 | 15 | 30 | 40 | 65 | 80 |
| | | 48 | 0.755 | 30 | 45 | 70 | 80 | 95 |
| Extrait éthanolique | | 6 | 0.094 | 0 | 5 | 15 | 25 | 35 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 10 | 25 | 30 | 40 |
| | | 24 | 0.378 | 20 | 30 | 40 | 55 | 60 |
| | | 48 | 0.755 | 40 | 45 | 60 | 70 | 80 |
| Extrait d'acétate d'éthyle | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 5 | 10 | 20 |
| | | 12 | 0.189 | 10 | 15 | 20 | 20 | 25 |
| | | 24 | 0.378 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 |
| | | 48 | 0.755 | 20 | 40 | 45 | 50 | 65 |
| Extrait chloroformique | | 6 | 0.094 | 0 | 5 | 15 | 25 | 30 |
| | | 12 | 0.189 | 5 | 10 | 20 | 30 | 45 |
| | | 24 | 0.378 | 15 | 20 | 35 | 40 | 60 |
| | | 48 | 0.755 | 20 | 25 | 40 | 60 | 85 |
| Extrait hexanique | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 5 | 10 | 10 |
| | | 12 | 0.189 | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| | | 24 | 0.378 | 5 | 20 | 30 | 35 | 40 |
| | | 48 | 0.755 | 10 | 25 | 30 | 40 | 55 |
| Extrait aqueux | | 6 | 0.094 | 0 | 0 | 10 | 15 | 20 |
| | | 12 | 0.189 | 5 | 15 | 20 | 35 | 40 |
| | | 24 | 0.378 | 10 | 20 | 30 | 40 | 65 |
| | | 48 | 0.755 | 40 | 60 | 65 | 80 | 90 |
| Témoin | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

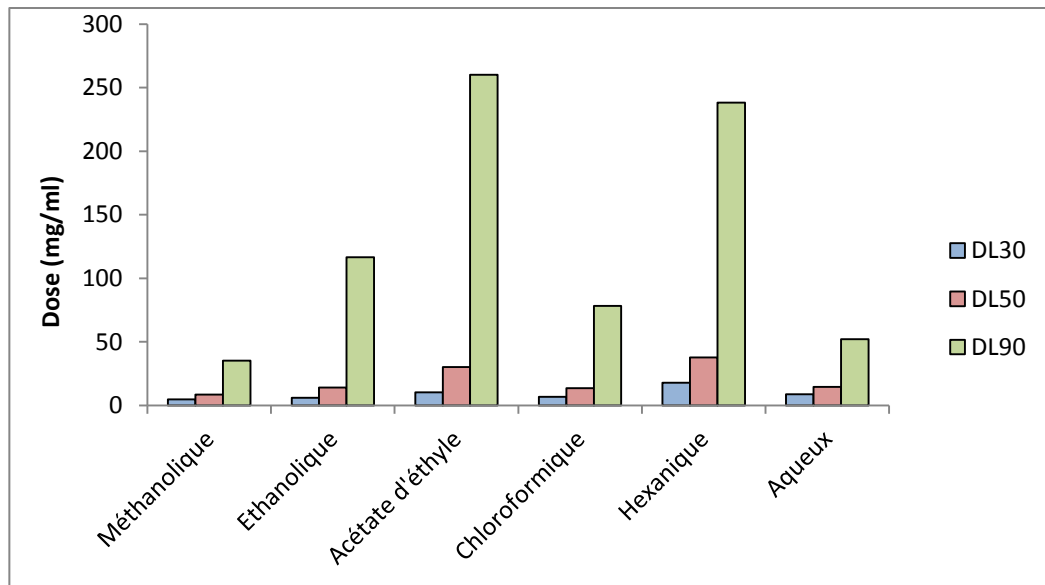


Figure 49 : Doses sublétales et létales des extraits de *Teucrium polium*.

2.7.3. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles testées par inhalation

➤ Cas de la menthe pouliot

Le pourcentage de la mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* par inhalation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* en fonction du temps est illustré sur la Figure 50.

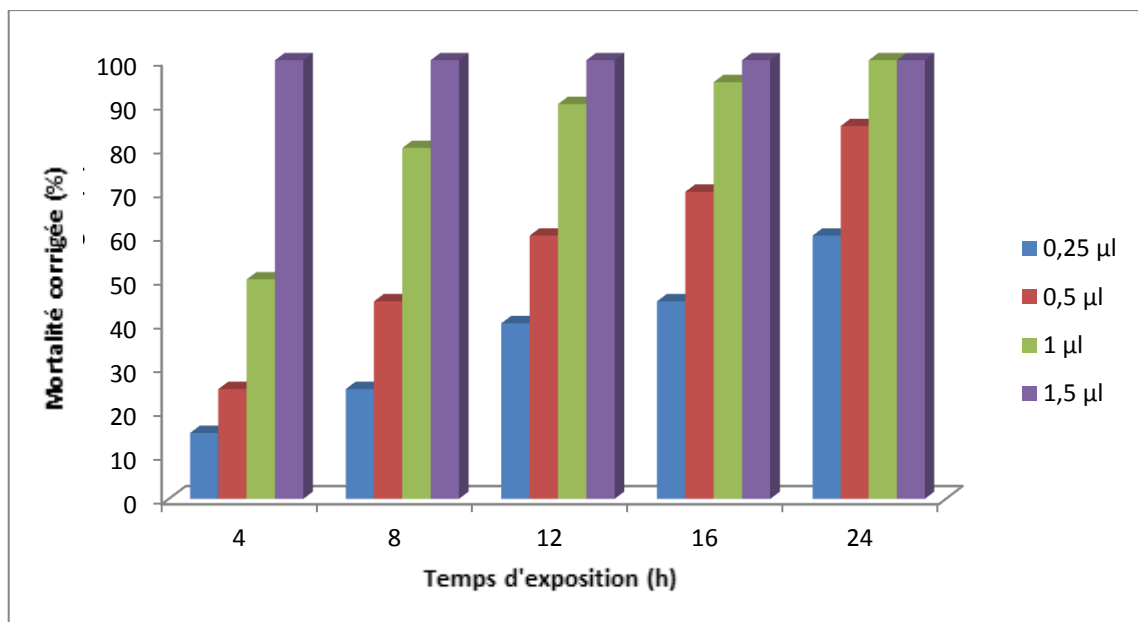


Figure 50 : Évolution dans le temps du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de *C. maculatus* traités avec l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par inhalation.

D'après les résultats décrits sur la Figure 50, nous constatons que l'exposition inhalatrice des adultes de *C. maculatus* aux différentes doses de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* entraîne une réduction considérable de leur longévité. Tandis que, chez la population témoin aucune mortalité n'est enregistrée. Notons également que la mortalité corrigée des insectes augmente progressivement avec l'augmentation du temps d'exposition. La mortalité totale des bruches (100%) est atteinte au bout de 4 h d'exposition à la dose de 1.5 μl (0.021 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$). Les temps létaux conduisant à la mort de 50 et 90% de la population de *C. maculatus* (TL₅₀ et TL₉₀), évalués par la droite de régression, sont de 4.52 et 10.07 h (Figure 51). Les faibles valeurs des TL₅₀ et TL₉₀ confirment la toxicité inhalatrice élevée de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. En effet, nous avons observé que les bruches manifestent un comportement agités dès leur introduction dans les pots saturés en odeur d'huile essentielle. Par conséquent, nous pouvons dire que l'essence de *Mentha pulegium* exerce un effet très dramatique sur les adultes de *C. maculatus*, qui se traduit par une hyperactivité, une paralysie et un *knock-down* rapide.

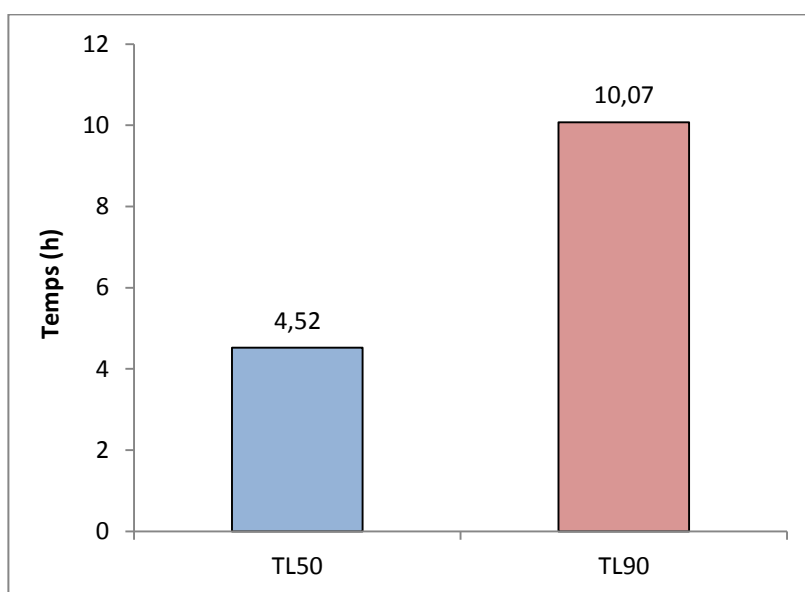


Figure 51 : TL₅₀ et TL₉₀ obtenus à partir des tracés des droites de régression de l'essai inhalation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* à l'égard de *C. maculatus*.

Les résultats obtenus dans la présente étude indiquent que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est plus toxique contre les adultes de *C. maculatus* par inhalation que par contact. Des résultats similaires ont été observés chez *Sitophilus oryzae* traité par les huiles essentielles extraites de raifort, de cannelle et de moutarde (Kim et al., 2003). Par ailleurs, nous pouvons dire que les vapeurs d'huile essentielle pénètrent le corps de l'insecte par voie respiratoire et

affectent son système nerveux. En effet, les monoterpènes sont généralement des composés volatils et plutôt lipophiles qui peuvent pénétrer rapidement dans les insectes et interférer avec leurs fonctions physiologiques (Lee et al., 2002).

➤ **Cas de la germandrée tomenteuse**

L'huile essentielle de *Teucrium polium* a également occasionné un effet toxique par inhalation contre les bruches (Figure 52). Par conséquent, les adultes de *C. maculatus* sont sensibles aux vapeurs biologiquement actives de l'huile essentielle de la germandrée. Au bout de 24h, la mortalité des insectes atteint les 70% à la dose de 60 μl (0.84 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$).

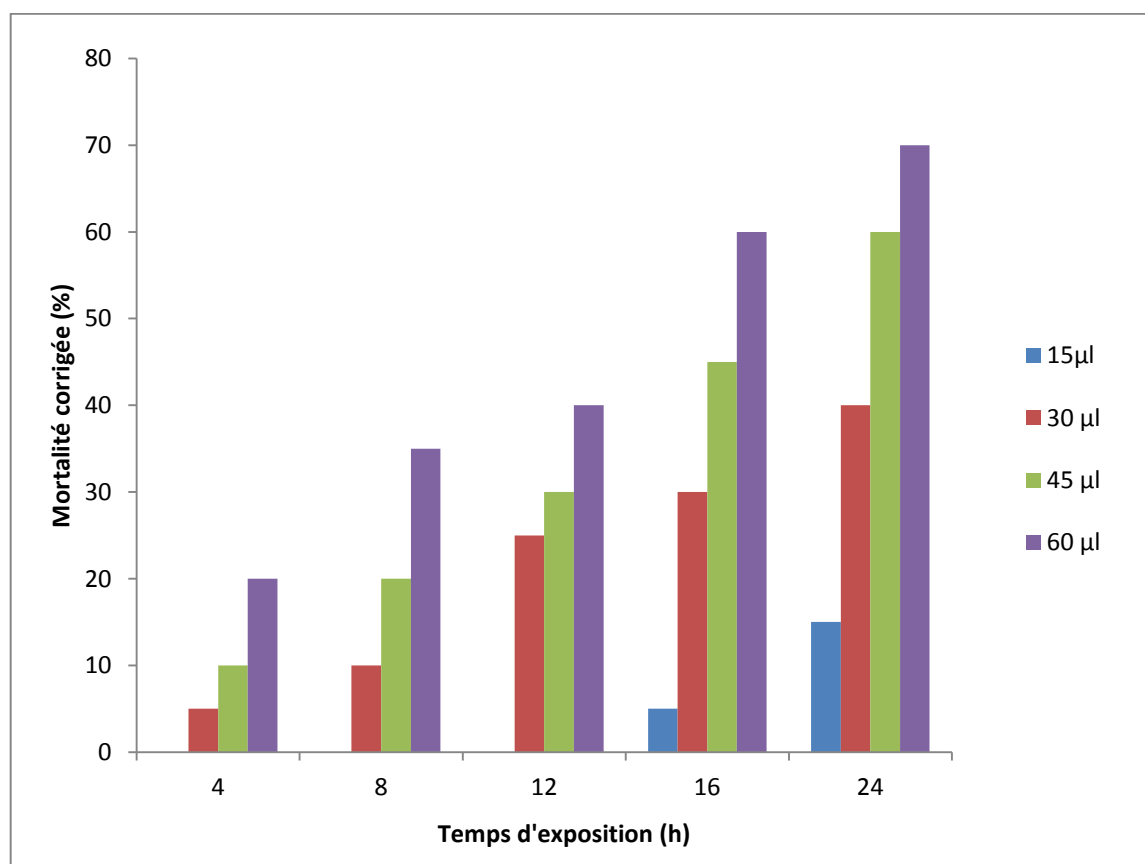


Figure 52 : Évolution dans le temps du pourcentage de la mortalité moyenne corrigée des adultes de *C. maculatus* traités avec l'huile essentielle de *Teucrium polium* par inhalation.

Les TL_{50} et TL_{90} obtenus à partir des tracés des droites de régression de l'essai inhalation de l'huile essentielle de *Teucrium polium* à l'égard de *C. maculatus* sont représentés sur la Figure 53. Les résultats de l'analyse des Probits montrent que l'essence de *Teucrium polium* (TL_{50} de 19.28 h) exerce un effet insecticide beaucoup moins efficace que celui de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (TL_{50} de 4.52 h) à l'égard des adultes de *C. maculatus*.

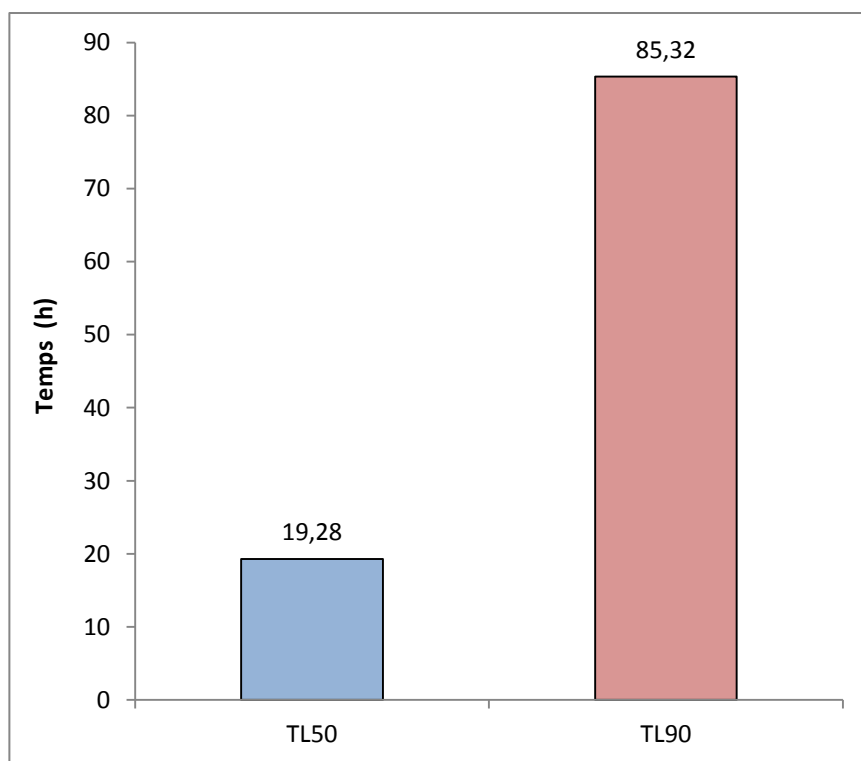


Figure 53 : TL₅₀ et TL₉₀ obtenus à partir des tracés des droites de régression de l'essai inhalation de l'huile essentielle de *Teucrium polium* à l'égard de *C. maculatus*.

2.7.4. Effet des huiles essentielles sur la fécondité des femelles de *Callosobruchus maculatus*

La fécondité est définie comme étant le nombre d'œufs pondus par femelle. Pour tester l'effet des huiles essentielles sur la fécondité des adultes de *C. maculatus*, nous dénombrons les œufs pondus par les femelles en les comparant au témoin. Le test de fécondité est réalisé dans des bocaux en verre où les adultes de *C. maculatus* âgés de 0-24 h se mettent en contact avec les graines de pois chiche traités par les doses sublétales DL₃₀ et DL₅₀ des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*.

Les fécondités moyennes des femelles de *C. maculatus* en fonction du temps dans les lots témoins et dans les lots traités par les DL₃₀ et DL₅₀ des huiles essentielles des deux Lamiaceae sont illustrées sur les Figures 54-57. La ponte des œufs chez *C. maculatus* se fait dans les 24 heures qui suivent l'accouplement. Le nombre d'œufs pondus dans les lots témoin est d'environ 80.14 ± 2.64 œufs/femelle évalué pour une durée de vie de 14 jours. L'effet insecticide des huiles essentielles testées s'accompagne d'une diminution du nombre d'œufs pondus par femelle.

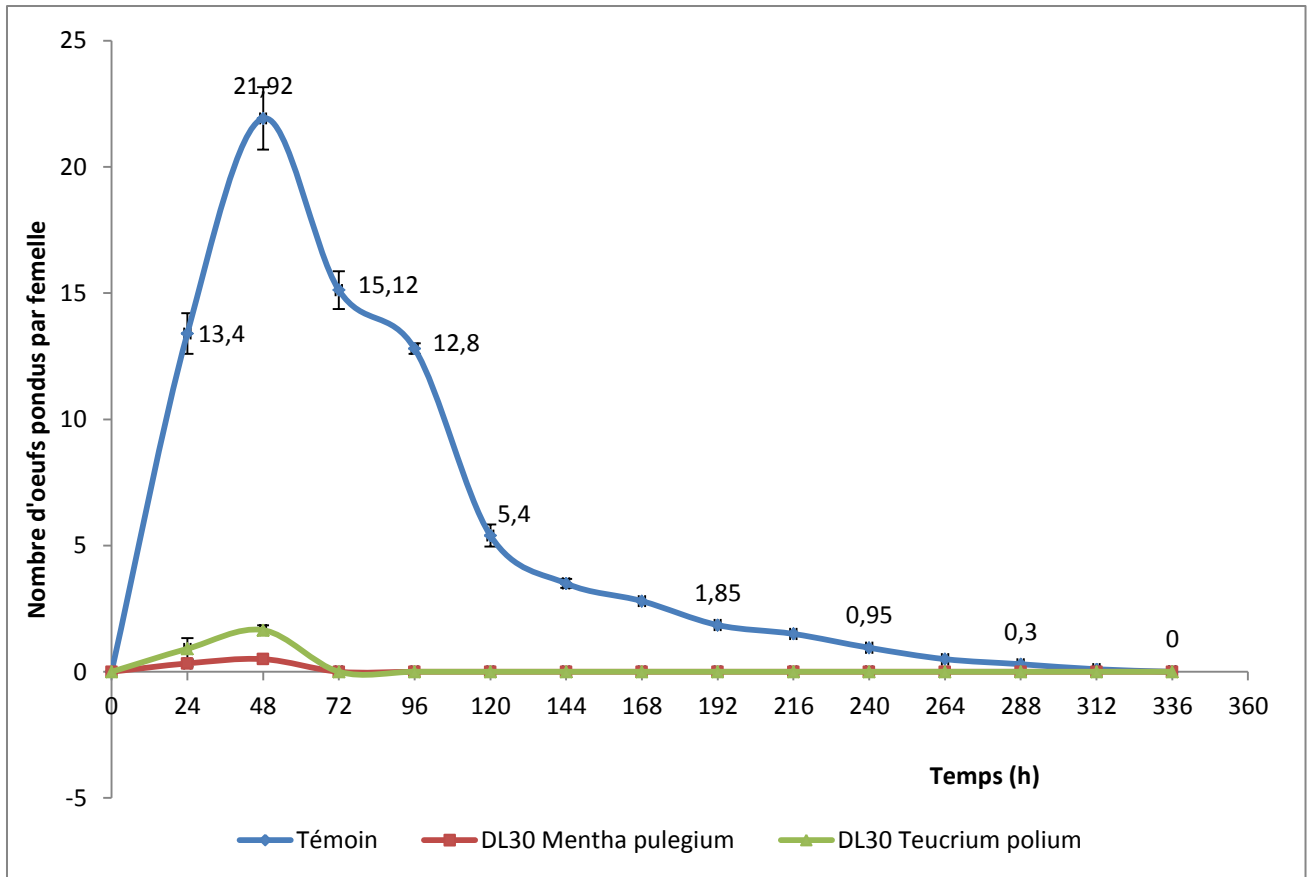


Figure 54 : Évolution dans le temps de la fécondité des femelles dans le lot témoin et dans les lots traités à la DL₃₀ d’huiles essentielles.

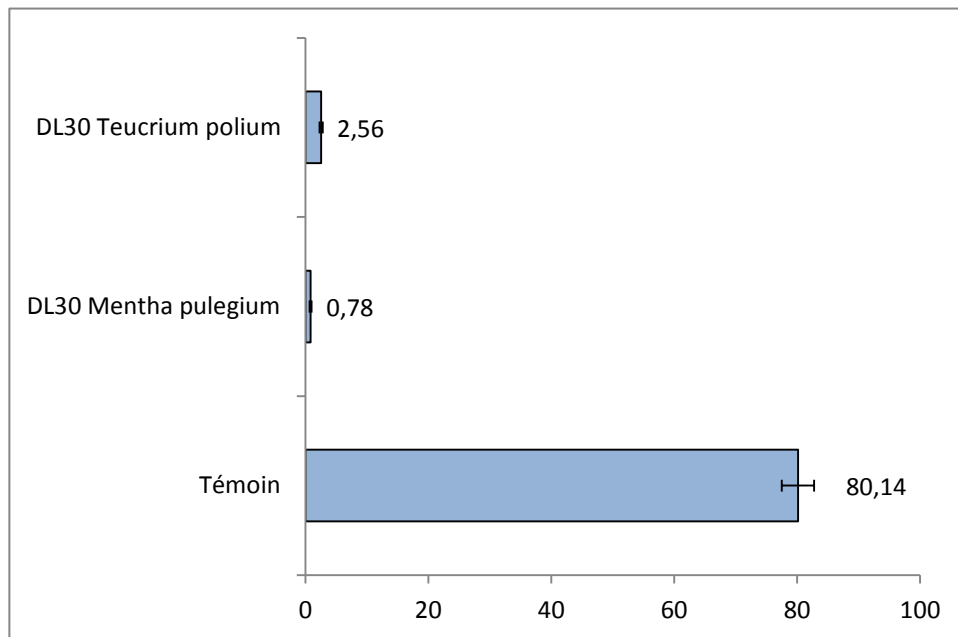


Figure 55: Nombre d’œufs moyen pondus par femelle durant sa vie dans le lot témoin et les lots traités à la DL₃₀ d’huiles essentielles.

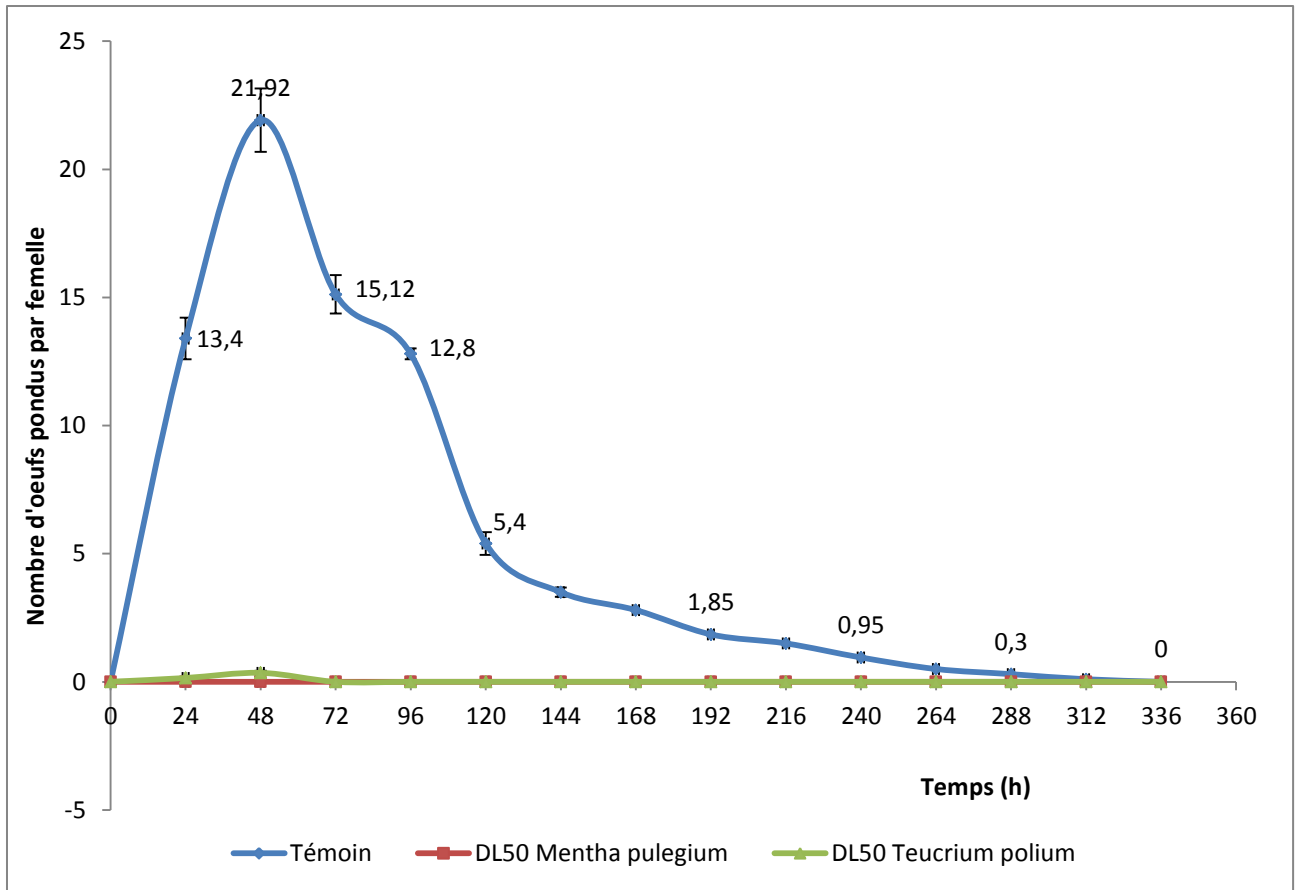


Figure 56 : Évolution dans le temps de la fécondité des femelles dans le lot témoin et dans les lots traités à la DL₅₀ d’huiles essentielles.

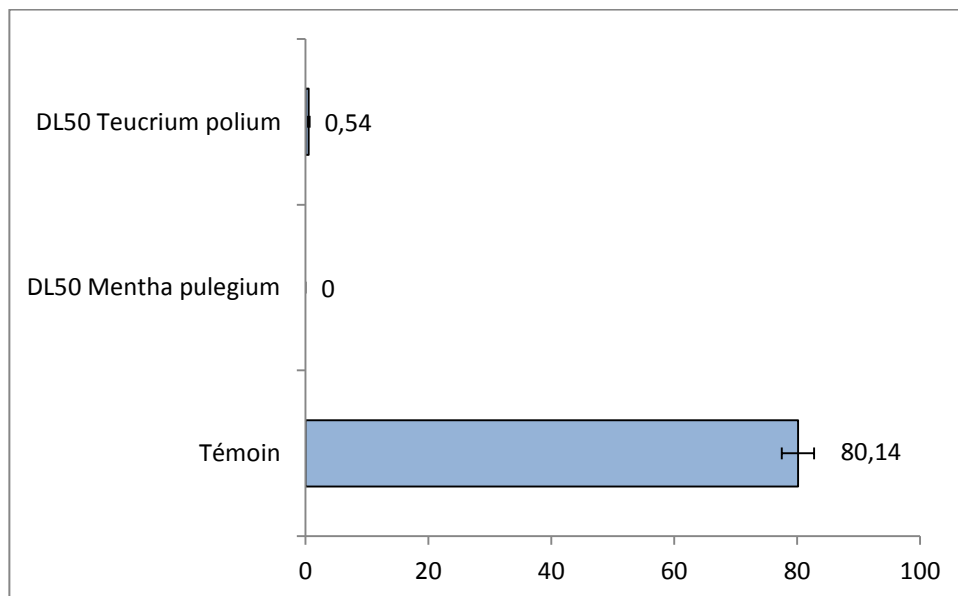


Figure 57 : Nombre d’œufs moyen pondus par femelle durant sa vie dans le lot témoin et les lots traités à la DL₅₀ d’huiles essentielles.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les huiles essentielles extraites de la menthe pouliot et de la germandrée affectent d'une manière significative la fécondité des femelles de *C. maculatus*. Par ailleurs, nous constatons que l'effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur la fécondité des femelles de *C. maculatus* varie selon la dose d'huile essentielle utilisée. En effet, nous remarquons que la fécondité diminue à fur et à mesure que les doses sublétales augmentent. La DL₃₀ de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* réduit le nombre d'œufs pondus, après les 48h qui suivent le traitement, à 0.78 ± 0.03 œufs/femelle, quant à celle de l'huile essentielle de *Teucrium polium* à 2.56 ± 0.24 œufs/femelle. Par conséquent, les DL₃₀ des huiles essentielles de la menthe pouliot et de la germandrée diminuent efficacement la fécondité des femelles des bruches avec un taux respectif de 99.02% et 96.80% par rapport au témoin. Pour les traitements à la DL₅₀, l'huile essentielle de la menthe pouliot inhibe complètement les pontes, alors que celle de la germandrée les réduit à 0.54 ± 0.08 œufs/femelle après 48 h. Cette réduction de la ponte serait le fait de la mort précoce des adultes de bruches due aux vapeurs d'huiles essentielles, comme l'ont montré **Schmidt et al.**, (1991), avec les huiles d'*Acorus calamus* sur *C. maculatus*. Des résultats similaires ont été rapportés par **Nyamador et al.**, (2017) sur l'effet des huiles essentielles de *Bidens borianiana*, *Chromolaena odorata*, *Cymbopogon giganteus* et *Cymbopogon nardus* sur la ponte de *C. maculatus* et *C. subinnotatus*. Dans la présente étude, l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de la menthe pouliot et la germandrée montre la présence des monoterpènes connus par leur effet sur la ponte des bruches. **Ajayi et al.**, (2014) ont indiqué que les monoterpènes inhibent la ponte des femelles de *C. maculatus*.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que les huiles essentielles extraites à partir de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* exercent une forte inhibition sur la reproduction de la bruche de pois chiche. Des résultats similaires ont été rapportés par **El-nahal et al.** (1994), en étudiant l'effet des huiles essentielles extraites d'*Acorus calamus* (Aracées) sur la fécondité de *C. maculatus*. **Seri-Koussi et al.**, (2004) ont rapporté que les huiles essentielles extraites de deux plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire, *Melaleuca quinquenervia* (Myrtacées) et *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), à la dose de $33.3 \mu\text{l/l}$, réduisent significativement la ponte des femelles de la bruche *C. maculatus* avec un taux respectif de réduction de $98.78 \% \pm 0.87$ et $99.94 \pm 0.35 \%$ par rapport au témoin. Selon **Kellouche et Soltani** (2004), sur les graines de pois chiche, les poudres des feuilles de quatre plantes riches en huiles essentielles (le figuier, l'olivier, le citronnier et l'eucalyptus) réduisent la fécondité des femelles de *C. maculatus*. **Kellouche** (2005) a montré que l'huile de clous de girofle *Syzygium aromaticum* (Myrtacées),

affecte de manière très hautement significative la fécondité de *C. maculatus*, elle est de 00 ± 00 œufs/10 femelles à la dose de $5 \mu\text{l}$ alors qu'elle est de 1134 ± 204.2 œufs/10 femelles dans les lots témoins. **Azziz** et **Abbas** (2010) ont rapporté que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* réduit significativement la fécondité des femelles de *C. maculatus* de 82.7, 83.1 et 88.2% respectivement à des concentrations de 1, 0.5 et 0.25%. Par ailleurs, aux concentrations de 63.7, 31.9, 15.9, 8.0 ou $4.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, l'huile essentielle d'*Artemisia judaica* a réduit la ponte des femelles de *C. maculatus* respectivement de 92.5, 86.0, 61.8, 42.7 et 12.5% (**Abd-Elhady**, 2012). De plus, **Izakhmeiri** et al., (2013) ont montré que la faible concentration létale (CL_{20}) de l'huile essentielle d'*Heracleum persicum* affectait négativement la fécondité des femelles de *C. maculatus* de 39.58%. Selon **Nattudurai** et al., (2017), les CL_{10} et CL_{30} de l'huile essentielle d'*Atalantia monophylla* ont réduit la fécondité des femelles de *C. maculatus* respectivement de 62.38 et 85.56%.

2.7.5. Effet des huiles essentielles sur l'éclosion des œufs de *Callosobruchus maculatus*

La fertilité est le pourcentage d'œufs éclos par rapport aux œufs pondus par femelle. Le taux d'éclosion maximal est enregistré dans le lot témoin avec un pourcentage de $92.33 \pm 4.45\%$. Cela signifie que la souche de *C. maculatus*, qui est connu pour sa forte fécondité (**Siabi**, 1996), bénéficie aussi de la très bonne fertilité de ses œufs.

D'après les résultats présentés dans la Figure 58, nous constatons que les deux huiles essentielles testées ont affecté négativement l'éclosion des œufs de *C. maculatus*. Notons également que la sensibilité des œufs augmente au fur et à mesure que les doses augmentent. En effet, les DL_{30} des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* réduisent nettement l'éclosion des œufs avec un taux respectif de $7.64 \pm 2.52\%$ et $13.56 \pm 4.12\%$ par rapport au témoin. La DL_{50} de l'essence de *Mentha pulegium* inhibe complètement l'éclosion des œufs, tandis que celle de l'huile essentielle de *Teucrium polium* la réduit à $4.71 \pm 1.25\%$.

Des résultats similaires ont été trouvés par **Azziz** et **Abbas** (2010), qui ont rapporté que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* réduit significativement l'éclosion des œufs de *C. maculatus* avec un pourcentage de 15.28, 20.90 et 25.84% respectivement aux doses 1, 0.5 et 0.25%. **Loni** et **Panahi**, (2014) ont indiqué que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* induit une forte mortalité des œufs de *C. maculatus*, puisque un taux de 85.2% est enregistré à la dose $2.85 \mu\text{l}/\text{ml}$ d'air.

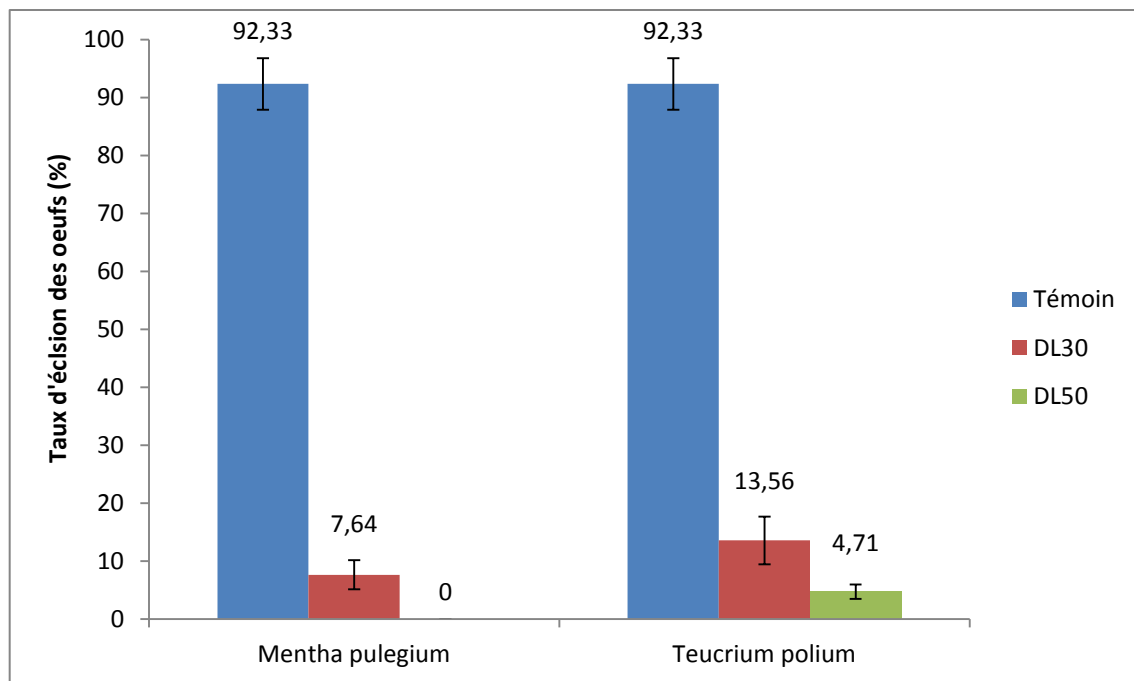


Figure 58 : Taux d'éclosion moyen des œufs dans les lots témoins et les lots traités aux DL₃₀ et DL₅₀ d'huiles essentielles.

En présence d'huile essentielle de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium*, le développement des œufs est affecté. Par conséquent, les essences testées ont donc des activités ovicides certaines contre les œufs de *C. maculatus*. L'activité ovicide des huiles essentielles s'explique par leur pouvoir pénétrant ou par la toxicité directe de leurs composants (**Don Pedro**, 1989). La toxicité des vapeurs d'huile essentielle de *Aeorus ealamus* sur les œufs de *Callosobruchus chinensis* a été signalée par **Schmidt** et *al.*, (1991) qui ont indiqué que les huiles essentielles avaient une action stérilisante sur les œufs. Sur les œufs de *C. maculatus*, les vapeurs d'huiles agissent à travers le tube respiratoire de l'œuf décrit par **Wightman** et **Southgate** (1982) et **Credland** (1992). **Don Pedro** (1989) explique que l'activité respiratoire des œufs de *C. maculatus* est six fois plus faible que celle des larves néoformées. Ceci traduit une faible activité des monooxygénases chez les œufs et donc une plus forte tolérance aux produits qui inhibent ces enzymes. D'après **Ducom** (1996), les œufs considérés comme un stade quiescent, sont plus tolérants vis-à-vis des insecticides de synthèse.

Les œufs affectés ont leur contenu ovulaire dissous mais le chorion reste intact (**Ketoh** et *al.*, 1998). La sensibilité des œufs de *C. maculatus* est due à la localisation de ces derniers à la surface des graines, alors la larve néonate se trouve exposée aux vapeurs toxiques des huiles essentielles sans barrière imperméable. Ceci est confirmé par **Regnault-Roger** (2008) qui nous

informe que le stade œufs de *C. maculatus* est toujours très sensible à l'air qui entoure les œufs surtout celles qui sont fraîchement pondus. En effet, les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* et *Ocimum basilicum* induisent la mort de 100% des œufs pondus âgés de 24h à partir de la dose 1.75 µl/l d'air. Tandis que, l'essence de *Cymbopogon schoenanthus* occasionne 80% de mortalité à la dose 2.5 µl/l d'air.

2.7.6. Effet des huiles essentielles sur l'émergence des adultes de *Callosobruchus maculatus*

L'effet des doses sublétales (DL₃₀ et DL₅₀) des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur l'émergence des adultes de *C. maculatus* est illustré sur la Figure 59. Les traitements aux huiles essentielles réduisent nettement le taux d'émergence par rapport au lot témoin où il est maximal (66.85±3.17%). D'après les résultats obtenus, nous constatons que le nombre d'individus adultes qui émergent des graines de pois chiche diminue avec l'augmentation de la dose des huiles essentielles testées. En effet, les DL₃₀ des huiles essentielles de menthe pouliot et de germandrée réduisent considérablement l'émergence avec des valeurs respectives de 9.52±1.65% et 18.68±2.13%. Notons par ailleurs que la DL₅₀ de l'essence de *Mentha pulegium* annule complètement l'émergence, quant à celle de *Teucrium polium* la fortement réduite (6.23±0.87%).

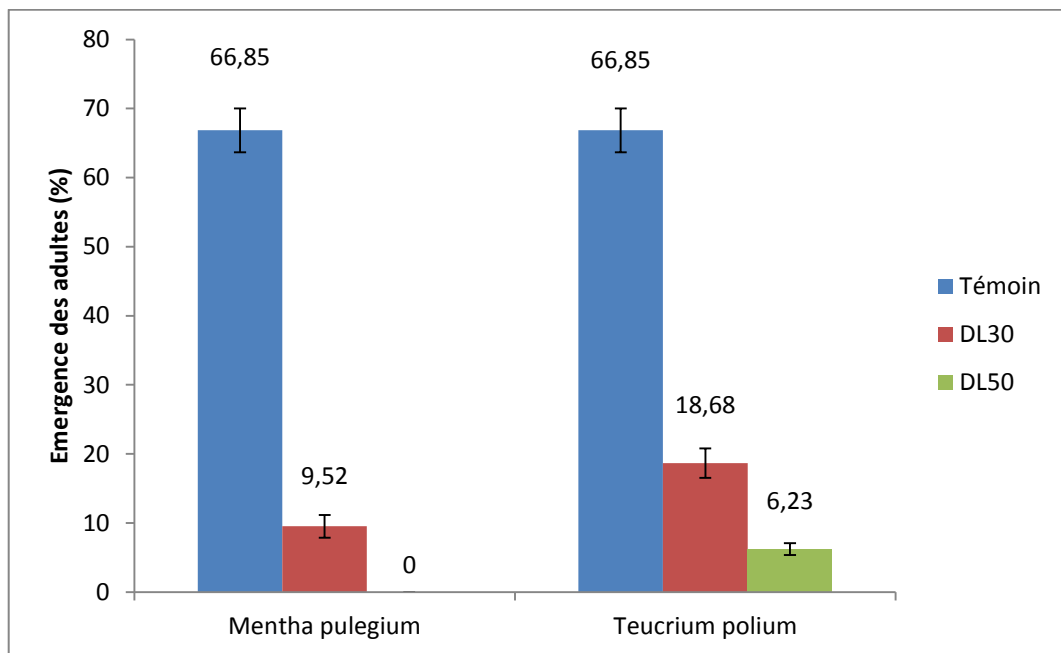


Figure 59 : Pourcentage moyen d'émergence des adultes dans les lots témoins et les lots traités aux DL₃₀ et DL₅₀ d'huiles essentielles.

Les huiles essentielles entravent également l'émergence des adultes de la bruche de pois chiche. Dans la présente étude, les deux huiles essentielles testées se sont révélées être de bons agents de contrôle des larves et nymphes de *C. maculatus* puisqu'elles sont efficaces même à faible concentration. Des travaux similaires ont été réalisés par **Azziz et Abbas** (2010), qui ont constaté que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* provoque 97.73, 95.72 et 94.67 % de mortalité des larves de *C. maculatus* respectivement aux doses de 1, 0.5 et 0.25 %. **Loni et Panahi** (2014) ont rapporté que l'essence de la menthe pouliot (2.85 μ /ml d'air) occasionne une mortalité de 63% des larves de *C. maculatus*.

L'effet larvicide des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* est probablement lié à l'action des composés terpéniques. **Regnault-Roger et al.**, (2008) ont rapporté que les composés terpéniques exhibent une activité larvicide contre les larves de bruches évoluant dans les cotylédons des graines de niébé. Par ailleurs, **Ajayi et al.**, (2014) ont trouvé que certains monoterpènes tels que l'eugénol et la menthone inhibaient complètement l'émergence des adultes de *C. maculatus*.

Dans la présente étude, nous avons constaté que les œufs de *C. maculatus* sont plus sensibles aux huiles essentielles testées que les larves et les nymphes se développant à l'intérieur de la graine de pois chiche. Cela pourrait être dû au fait que le tégument de la graine agit comme une barrière à la pénétration des huiles essentielles (**Loni et Panahi**, 2014). Selon **Regnault-Roger et al.**, (2008), les constituants physico-chimiques de la graine freineraient la pénétration des composés présents dans l'atmosphère du flacon et les larves et les nymphes ne seraient exposées qu'à de faibles concentrations de substance insecticide à l'intérieur des galeries. De même, **Boateng et Kusi** (2008) ont signalé que l'huile de graines de *Jatropha* était hautement toxique pour les œufs de *C. maculatus* comparativement aux larves. Par ailleurs, nous pouvons considérer que l'essence de *Mentha pulegium*, signalée précédemment comme ayant le meilleur effet adulticide et ovicide sur *C. maculatus*, exerce aussi la meilleure activité larvicide. Cette huile essentielle peut donc être considérée, dans les limites de nos conditions expérimentales, comme le meilleur agent insecticide de contrôle de l'ensemble des stades de développement de *C. maculatus*.

Conclusion

Conclusion

Les résultats de ce travail de recherche qui a porté sur l'étude de la composition chimique et de l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae, nous permettent de conclure ce qui suit :

L'optimisation de l'extraction des essences de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* par la méthodologie des surfaces de réponses (MSR), indique que le rendement en huile essentielle augmente avec l'augmentation du temps d'extraction, de la puissance ultrasonique et du rapport matière végétale/eau. Les conditions optimales permettant d'obtenir le rendement maximal en huile essentielle des deux Lamiaceae sont une durée d'extraction de 60 min, une puissance ultrasonique de 60 W et un rapport matière végétale/eau de 1:12 g/ml. Par ailleurs, l'hydrodistillation assistée par ultrasons s'est avérée être une technique appropriée pour obtenir un rendement d'extraction maximal des huiles essentielles de la menthe pouliot (2.42%) et de la germandrée (0.68%), tout en réduisant considérablement le temps d'extraction.

L'étude de l'influence du type de solvant sur le rendement d'extraction des deux Lamiaceae montre que parmi les différents solvants utilisés dans la présente étude, le méthanol a permis d'obtenir le meilleur rendement d'extraction pour la menthe pouliot (18.89 ± 0.56 %) ainsi que pour la germandrée (23.33 ± 0.61 %).

Les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par GC/MS ont montré que l'isomenthone (31.1%), la pulégone (34.8%) et la menthone (10.4%) sont les principaux constituants. Quant à la composition chimique de l'essence de *Teucrium polium*, elle est marquée par la présence du t-cadinol (17.9%), de la germacrène D (16.1%) et de la β -pinène (9.7 %) comme composés majoritaires.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux a montré que parmi les six solvants testés dans notre étude, le méthanol s'est avéré être le solvant le plus approprié pour l'extraction de la teneur la plus élevée en composés phénoliques à partir des parties aériennes des deux Lamiaceae.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les résultats ont révélé que les huiles essentielles des deux Lamiaceae possèdent une faible capacité anti-radicalaire et réductrice comparée à celle des antioxydants de synthèses (BHT et Trolox). Tous les extraits de *Mentha*

pulegium et de *Teucrium polium* ont révélé une forte activité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS^{•+} et un pouvoir réducteur puissant. Toutefois, les extraits méthanoliques des deux Lamiaceae ont présenté le meilleur potentiel antioxydant.

L'étude qualitative de l'activité antimicrobienne nous a permis de conclure que les huiles essentielles et les extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* expriment un pouvoir inhibiteur intéressant qui varie en fonction des souches testées. Il ressort, de cette étude, que l'huile essentielle de *Teucrium polium* est efficace sur les souches étudiées, en particulier sur *Staphylococcus aureus* (34 ± 0.36 mm). L'étude quantitative a révélé que les valeurs des CMI et des CMB obtenues varient en fonction des souches microbiennes testées et des huiles essentielles et des extraits utilisés. Notons également qu'*E. coli* et *Staphylococcus aureus* se sont avérées être les souches les plus sensibles sous l'action des huiles essentielles étudiées avec des valeurs très faibles de la CMI (0.03 à 0.06 %).

Les résultats de l'activité insecticide indiquent que les huiles essentielles et les extraits des plantes étudiées peuvent être utilisés comme biopesticides pour la protection des graines de pois chiches stockées. La présente recherche a démontré que les huiles essentielles des deux Lamiaceae sont actives contre divers stades de croissance de *C. maculatus*. Toutefois, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* s'est avérée avoir l'activité adulticide (DL_{50} de 0.311 μ l et TL_{50} de 4.52 h), ovicide et larvicide la plus efficace à l'égard de *C. maculatus*. De plus, la DL_{50} de l'huile essentielle de la menthe pouliot inhibe complètement les pontes des femelles de la bruche. À la lumière de l'intérêt récent pour le développement d'insecticides à base de plantes contre les ravageurs des denrées stockées, ces substances naturelles bioactives seraient un produit respectueux de l'environnement et sans danger pour l'application.

Pour les perspectives de recherche sur les huiles essentielles et les extraits des deux Lamiaceae, il serait intéressant de mener un travail approfondi pour étudier les possibilités d'incorporation des huiles essentielles et des extraits des deux plantes étudiées en tant qu'antioxydant et antimicrobien naturel dans les aliments élaborés ainsi qu'en pharmacologie et cosmétologie. Il serait également intéressant de formuler des biopesticides à base des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées pour la gestion des insectes ravageurs des denrées stockées. Par ailleurs, des travaux supplémentaires doivent être entrepris pour identifier et isoler les composés phénoliques des différents extraits examinés responsables des activités biologiques étudiées.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. **Abbott, W., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2): 265-267.
2. **Abdalla, A.E., & Roozen, J.P., 1999.** Effect of Plant Extracts on the Oxidative Stability of Sunflower Oil and Emulsion. *Food Chemistry*, 64: 323-329.
3. **Abdelgaleil, S. A., Mohamed, M. I., Badawy, M. E., & El-arami, S. A., 2009.** Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of chemical ecology*, 35(5): 518-525.
4. **Abd-Elhady, H., 2012.** Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Protection Research*, 52(3): 347-352.
5. **Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., & Maachi, R., 2016.** Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94: 197-205.
6. **Abu-Darwish, M. S., Al-Ramamneh, E. A., Kyslychenko, V. S., & Karpiuk, U. V., 2012.** The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region-South of Jordan. *Pak J Pharm Sci*, 25(1): 239-246.
7. **Abulla, Z. S. A., Abdulameer, R., & Abdulkareem, A., 2009.** Extraction and Antibacterial activities of *Teucrium polium* (Algeada) growing in Iraq. *Journal of University and Fundamental Education*, 59: 1-4.
8. **Adams, R. P., 1995.** Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4th Edn, Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois.
9. **Adams, R. P., 2001.** Identification of essential oils components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publ.Corp., Carol stream, IL. 445 p.
10. **Adaramola, B., & Onigbinde, A., 2017.** Influence of extraction technique on the mineral content and antioxidant capacity of edible oil extracted from ginger rhizome. *Chem Int.*, 3(1): 1-7.
11. **Addai, Z. R., Abdullah, A., & Mutalib, S. A., 2013.** Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46): 3354-9.
12. **Aghraz, A., Wanner, J., Schmidt, E., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., & Jirovetz, L., 2017.** Chemical Composition, in vitro Antioxidant,

- Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil from *Cladanthus arabicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3): 601-609.
13. **Agnihotri, V. K., Agarwal, S. G., Dhar, P. L., Thappa, R. K., Baleshwar Kapahi, B. K., Saxena, R. K. & Qazi G. N., 2005.** Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Frag. J.*, 20: 607–610.
 14. **Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N., 2008.** Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2): 189-199.
 15. **Ahmed, A. M., Ozbak, H. A., & Hemeg, H. A., 2015.** Effect of essential oil of traditional two Saudi mint types and its possible role in cardiovascular and throat health. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(5): 8060-8064.
 16. **Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., & Conchello, P., 2011.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14): 2643-2651.
 17. **Ajayi, O. E., Appel, A. G., & Fadamiro, H. Y., 2014.** Fumigation Toxicity of Essential Oil Monoterpenes to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Journal of Insects*, 1-7.
 18. **Akerele, O., 1984.** WHO's traditional medicine programme: progress and perspectives. *Journal WHO Chron.*, 38(2): 76-81.
 19. **Akhtar, T., Hameed, S., Al-Masoudi, N., Loddo, R., & Colla, P., 2008.** In vitro antitumor and antiviral activities of new benzothiazole and 1, 3, 4-oxadiazole-2-thione derivatives. *Acta pharmaceutica*, 58(2): 135-149.
 20. **Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G., & Lindequist, U., 2007.** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3): 657-666.
 21. **Ali, I. B. E. H., Bahri, R., Chaouachi, M., Boussaid, M., & Harzallah-Skhiri F., 2014.** Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Ind. Crops Prod.*, 62: 188–195.
 22. **Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A., 2009.** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.*, 115: 785-788.
 23. **Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbad, J., Alamarneh, A. A., Sawahreh, R. A., & Odeh, I., 2017.** Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 14(2): 130-141.
 24. **Alves, A. P. C., Corrêa, A. D., Alves, D. S., Saczk, A. A., Lino, J. B. R., & Carvalho, G. A., 2014.** Toxicity of the phenolic extract from jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) fruit skins on *Spodoptera frugiperda*. *Chilean journal of agricultural research*, 74(2): 200-204.

25. **Alviano, D. S., & Alviano, C. S., 2009.** Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1): 106-121.
26. **Andrews, J M., 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48(1): 5-16.
27. **Ardestani, A., & Yazdanparast, R., 2007.** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12): 2402-2411.
28. **Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., & Witier, P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed Masson, Paris.
29. Arvy, M.P., & Gallouin, F., 2003. Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris, 412 p.
30. **Asgharipour, M.R., & Shabankare, H.G., 2017.** Comparison of chemical composition of *Teucrium polium* essential oil affected by phenological stages. *Bangladesh J. Bot.*, 46(2): 583-588.
31. **Ashnagar, A., Gharib, N., & Foroozanfar, S. 2007.** Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium polium* plants grown in Khuzestan province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry*, 25: 1171-1173.
32. **AshokKumar, B.S., Lakshman, K., Chandrasekhar, K.B., Saleemullakhan, & Narayana Swamy, V.B, 2008.** Estimation of rutin and quercetin in *Amaranthus spinosus* L. *Asian J. Chem.*, 20(2): 1633–1635
33. **Association Française de Normalisation (AFNOR), 2000.** Huiles Essentielles, Tome 2, Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles. 6th ed. AFNOR, Association Française de Normalisation; Paris, France.
34. **Aycan, M., Yildiz, M., Darcin, S., Tunc, K., Hos, A., & Dundar, E., 2015.** Antibacterial Activity of *Mentha pulegium* L. from Turkey. *American Journal of Life Sciences*, 3(6): 383-386.
35. **Aziz, E.E., & Abbas M.H., 2010.** Chemical composition and efficacy of five essential oils against the pulse beetle *C. maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8(4): 411-419.
36. **Bajpai, V. K., Sharma, A., & Baek, K. H., 2013.** Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32: 582–590.
37. **Bakari, S., Ncir, M., Felhi, S., Hajlaoui, H., Saoudi, M., Gharsallah, N., & Kadri, A., 2015.** Chemical composition and in vitro evaluation of total phenolic, flavonoid, and antioxidant properties of essential oil and solvent extract from the aerial parts of *Teucrium polium* grown in Tunisia. *Food Science and Biotechnology*, 24(6): 1943-1949.
38. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M., 2008.** Biological effects of essential oils. *Food. Chem.Toxicol.*, 46: 446–475.
39. **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S., 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1): 191-203.

40. **Balick, M. J., Elisabetsky, E., & Laird S. A., 1996.** Medicinal resources of the tropical forest - biodiversity and its importance to human health. *Columbia University Press*, 464 p.
41. **Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., & Viuda-Martos, M., 2017.** Assessment of Antioxidant and Antibacterial Properties on Meat Homogenates of Essential Oils Obtained from Four Thymus Species Achieved from Organic Growth. *Foods*, 6(8): 59.
42. **Barros, D.S.A., de Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., & de Sousa, H. A., 2015.** Chemical composition and functional properties of essential oils from Mentha species. *Industrial Crops and Products*, 76: 557-564.
43. **Bartels, C. L., & Miller, S. J., 1998.** Herbal and related remedies. *Nutrition in clinical practice*, 13(1): 5-19.
44. **Başer, K. H. C., & Buchbauer, G., 2010.** Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. *CRC Press. UK*.
45. **Başer, K. H. C., Kürkcüoğlu M., Tarimicilar G., & Kaynak G., 1999.** Essential oils of Mentha species from northern Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 11: 579-588.
46. **Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C., & Dicko, M. H., 2012.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12): 1070-1074.
47. **Bedir, E., Tasdemir, D., Çalis, I., Zerbe, O., & Sticher, O., 1999.** Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 51: 921-925.
48. **Bekhechi, C., 2008.** Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie, 209 p.
49. **Belmekki, N., Bendimerad, N., Bekhechi, C., & Fernandez, X., 2013.** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14): 897-902.
50. **Ben Othman, M., Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Ncibi, S., Elaissi, A., & Zourgui, L., 2017.** Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (L.H.) from Tunisia. *Physiol Mol Biol Plants*, 23(3): 723-729.
51. **Benayad, N., 2008.** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Faculté des Sciences Rabat, Maroc, 240 p.
52. **Benayad, N., 2013.** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. In Thèse de Doctorat, Discipline : Chimie, Spécialité : Chimie Organique. Faculté Sciences de Rabat, Université Mohammed V- Agdal, 186 p.
53. **Benayad, N., Ebrahim, W., Hakiki, A., & Mosaddak, M., 2012.** Chemical characterization and insecticidal evaluation of the essential oil of *Mentha suaveolens*

- L. and *Mentha pulegium* L. growing in Morocco. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, Bacau*, 13(1): 27-32.
54. **Benchelah, A. C., Bouzian, H., & Maka, M., 2004.** Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 6: 191-197.
55. **Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J. M., Bernardini, A. F., & Costa, J., 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1): 132-139.
56. **Benov, L., 1994.** The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*, 8: 92-94.
57. **Berg, P.A., & Daniel, P.T., 1988.** Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in Clinical and Biological Research, Cody V, Middleton E, Harborne JB (Eds) 280, Liss AR Inc., New York, p.p. 157-171.
58. **Bezić, N., Vuko, E., Dunkić, V., Ruščić, M., Blažević, I., & Burčul, F., 2011.** Antiphytoviral Activity of Sesquiterpene-Rich Essential Oils from Four Croatian *Teucrium* Species. *Journal of molecules*, 16: 8119-8129.
59. **Bicchi, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., D'Acompara Zellner, B., Costa, R., & Rubiolo, P., 2008.** Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.*, 23: 382-391.
60. **Billing, J., & Sherman, P. W., 1998.** Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.*, 73: 3-49.
61. **Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., & Kishimura, H., 2008.** Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106: 185–193.
62. **Biswas, S., Dasgupta, N. & De, B., 2010.** “Antioxidant Activity of Some Indian Medicinal Plants used for the Treatment of Diabetes Mellitus”. *Pharmacologyonline*, 3: 7-12.
63. **Boateng, B. A., & Kusi, F., 2008.** Toxicity of *Jatropha* seed oil to *Callasobruchus maculatus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(8): 945-951.
64. **Boligon, A. A., Machado, M. M. & Athayde, M. L., 2014.** Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med. chem.*, 4(7): 517-522.
65. **Bondi, D., Cianci, P., Geraci, C., & Giuseppe, R., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Fragr J.*, 8: 331-337.
66. **Botineau, M., 2010.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris, p.p. 1021-1043.
67. **Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L. M., & Hmamouchi M., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Phytochem.*, 89: 165-169.

68. **Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D., 2011.** Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4): 267-275.
69. **Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. & Chefrou, A., 2016.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85: 174-189.
70. **Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N., 2017.** Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie*, 15(6): 379-383.
71. **Box, G. E. P., & Behnken, D. W., 1960.** "Some New Three-Level Designs for the Study of Quantitative Variables," *Technometrics*, 2: 455-475.
72. **Box, J., & Wilson, W., 1951.** Central composites design. *JR Stat Soc, I*: 1-35.
73. **Bradley, N., 2007.** The response surface methodology (Doctoral dissertation, Indiana University South Bend), 84 p.
74. **Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., Drifa, Y.-G., Fahmi, E. M., Khodir, M., & Mohamed, C., 2016.** Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88: 96-105.
75. **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25-30.
76. **Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U., 2016.** Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7): 901-914.
77. **Brühlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P. A., & Testa, B., 2004.** Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry & biodiversity*, 1(6): 819-829.
78. **Bruneton, J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. La Voisier TEC et DOC, Paris. 2ème édition, p.p. 268-277.
79. **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120 p.
80. **Bruneton, J., 2008.** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. p.p. 198-260.
81. **Bruno, M., Maggio, A. M., Piozzi, F., Puech, S., Rosselli, S., Simmonds, & M.S.J., 2003.** Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *polium* and their antifeedant activity. *Biochemical Systematic and Ecology*, 31: 1051-1056.
82. **Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A., 1993.** Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(1): 49-55.
83. **Burits, M., & Bucar, F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5): 323-328.

84. **Burt, S. A., & Reinders, R. D., 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, 36(3): 162-167.
85. **Burt, S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253.
86. **Butsat, S., & Siriamornpun, S., 2010.** Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2): 606-13.
87. **Caboni, P., Saba, M., Tocco, G., Casu, L., Murgia, A., Maxia, A., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Ntalli, N., 2013.** Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(41): 9784-9788.
88. **Cabredo, P. S., Cedron-Fernandez, T., Gonzalez-Briongos, M., PuentePascual, L., & Saenz-Barrio, C., 2006.** Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples : Optimization of the method. *Talanta*, 69: 1123-1129.
89. **Caillet, S., & Lacroix, M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA), p.p. 1- 8.
90. **Camps, F., Coll, J., Dargallo, O., Rius, J., & Miravittles, C., 1986.** Clerudane diterpenozds from *Teucrium* and *Aguga* plants. *Photochemistry*, 26(5):1475-1479.
91. **Cantino P.D., 1998.** Binomials, hyphenated uninominals, and phylogenetic nomenclature. *Taxon.*, 47: 425-429.
92. **Carette Delacour, A.S., 2000.** La Lavande et son Huile Essentielle. Ph.D. Thesis. Université Lille 2; Lille, France, 201 p.
93. **Carreiras, M. C., Rodriguez, B., Piozzi, F., Savona, G., Torres M. R. & Perales, A., 1988.** A chlorine-containing and two neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *Vzncentznum*. *Phytochemistry*, 28(5): 1453-1461.
94. **Carson, C.F. & Riley, T.V., 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3): 264–269.
95. **Castelo, A. V. M., Del Menezzi, C. H. S., & Resck, I. S., 2012.** Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *J. Appl. Sci*, 12: 753-760.
96. **Caswell, G. H., 1961.** The infestation of cowpeas in Western Nigeria. *Trop. Sci.*, 3: 154–158.
97. **Cazzola, C., & Doublet, C., 2015.** Mise au point d'une technique de séparation et de quantification des composés présents dans une huile essentielle. Rapport PE huiles essentielles, projet de l'Institut National des Sciences Appliquées de Rouen (INSA). p.p. 13-14.

98. **Ceyhan-Güvensen N., & Keskin D., 2016.** Chemical content and antimicrobial properties of three different extracts of *Mentha pulegium* leaves from Mugla Region, Turkey. *J Environ Biol.*, 37(6): 1341-1346.
99. **Chaintreau, A., Joulain, D., Marin, C., Schmidt, CO., & Vey, M., 2003.** Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *J Agric. Food. Chem.*, 51: 398-403.
100. **Chalchat, J.C., Gorunovic, M.S., Maksimovic, Z.A. & Petrovic, S. D., 2000.** Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *J. Essent. Oil Res.*, 12: 598–600.
101. **Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Ksouri, R., & Atik-Bekkara, F., 2014.** Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *J Chin Med Assoc.*, 77(6): 302-307.
102. **Chaudhry, P.S., Cabrera, J., & Juliani, H.R., 1983.** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.*, 3 (13): 1995-1998.
103. **Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. & Abert-Vian, M., 2017.** Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review. *Ultrasonics Sonochem.*, 34: 540-560.
104. **Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M. K., 2010.** Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813- 835.
105. **Chemat, F., Lucchesi M. E., & Smadja, J., 2004a.** Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. Brevet Américain, US 2004/0187340 A1.
106. **Chemat, F., Huma Z., & Khan, M. K., 2011.** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813-835.
107. **Chemat, S., Lagha, A., Ait Amar, H., Bartels, P. V., & Chemat, F., 2004b.** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(3), 188-195.
108. **Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R., & Laglaoui, A., 2014.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22: 221-229.
109. **Clifford, M. N., 1999.** Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3): 362-372.
110. **Cook, C.M., Maloupa, E., Kokkini, S., & Lanaras, T., 2000.** Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* L plants from Zakynthos Greece. *J. Essent. Oil Res.*, 12: 598-600.
111. **Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B., 2008.** Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high

- hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 85–91.
112. **Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F., 1999.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2): 130-135.
113. **Couplan, F., 2000.** Dictionnaire étymologie de botanique .Nestlé (Ed). Luisane. Paris.
114. **Cowan, M. M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-582.
115. **Cox, S. D., Gustafson, J.F., Warmington, J.R., & Wyllie, S.G., 1991.** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Malaleuca alternifolia essential oils. *J.Appl. Microbiol.* 88: 170- 175.
116. **Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1): 170-175.
117. **Credland, P. F., 1992.** The structure of bruchid eggs may explain the ovicidal effect of oils. *Journal of Stored Products Research*, 28(1): 1-9.
118. **Cristina, L., Maria, T., Ilona, V., Eva, S., & Klara, S., 2004.** Propriété antioxydante des huiles volatiles déterminée par la capacité réductrice ferrique. *Z. Naturforsch*, 59c: 354-358.
119. **Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G., 2000.** Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of plant Physiologists, 24: 1250-1319.
120. **D’Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43: 348- 361.
121. **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris, 317 p.
122. **Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. *Crop. Protection*, 22: 39–44.
123. **Daglia, M., 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2): 174-181.
124. **Daniel, M., 2006.** Medicinal Plants: chemistry and properties; Ed: SCIENCE PUBLISHERS. p.p. 59-77.
125. **Dastmalchi, K., Damien Dorman, H. J., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R., 2008.** Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food. Sci. tech LWT.* 41(3): 391-400.
126. **De La Cruz Perez A., Romero Napoles J., Carrilo Sanchez J. L., Garcia Lopez E., Grether Gonzalez R., Sanchez Soto S. & Perez De La Cruz M., 2013.**

- Brùquidos (Coleoptera: Bruchidae) Del Estado de Tabasco, Mexico. *Acta Zoologica Mexicana (n.s.)*, 29(1): 1-95.
127. **De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., & Evangelista, G., 2012.** Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133(1): 21-28.
128. **De Oliveira, Z. D. M. R., 2014.** Educação Infantil: fundamentos e métodos. Cortez Editora, 265 p.
129. **Delille, L., 2007.** Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger, 240 p.
130. **Delobel, A., & Tran M., 1993.** Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Faune Tropicale XXXII. ORSTOM/ CTA Eds, Paris, 424 p.
131. **Desjobert, J. M., Bianchini, A., Tommy, P., Costa, J. & Bernardini A. F., 1997.** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*, 25(6): 13-16.
132. **Desmier, T., 2016.** Les antioxydants de nos jours: définition et applications (Doctoral dissertation), 88 p.
133. **Devi, V. G., Rooban, B. N., Sasikala, V., Sahasranamam, V., & Abraham, A., 2010.** Isorhamnetin-3-glucoside alleviates oxidative stress and opacification in selenite cataract in vitro. *Toxicol In Vitro*, 24: 1662-1669.
134. **Dhawan D., & Gupta J., 2017.** Comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from *Datura metel* plant leaves. *Int. J. Biol. Chem.*, 11: 17-22.
135. **Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W., 2016.** Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3(4): 25-39.
136. **Diaz-Maroto, M.C., Castillo, N., Castro-Vazquez, L., Gonzalez-Vinas, M.A. & PerezCoello, M.S., 2007.** Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants. *Flavour Frag. J.*, 22: 114-118.
137. **Didry, N., Dubreuil, L., & Pinkas, M., 1993.** Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmazie*, 48(4): 301-304.
138. **Djabou, N., 2012.** *Caractérisation et variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de Corse et de l'Ouest algérien* (Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli; Université de Tlemcen), 216 p.
139. **Djenane, D., Yangüela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., & Roncalés, P., 2011.** Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International*, 17(6): 505-515.
140. **Do Q.D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, & Y.H., 2014.** Effect of extraction solvent on total

- phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.*, 22(3): 296-302.
141. **Don Pedro, K. N., 1989.** Mechanisms of action of some vegetable oils against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) on wheat. *J. Stored Prod. Res.* 25: 217–223.
142. **Donia, A. E. R. M., Alqasoumi, S. I., Radwan, A. M., Bur, J., & Craker, L. E., 2012.** Phytochemical screening and insecticidal activity of three plants from Chenopodiaceae family. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(48): 5863-5867.
143. **Dorman, H. J. D. & Deans, S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88(2): 308-16.
144. **Dridi, A., Hadeif, Y., & Bouloudani, L., 2016.** Determination of Total Phenol, Flavonoid, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Teucrium polium* L. in Algerian East. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(10): 1566-1570.
145. **Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y., 2015.** In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol*, 6: 58.66.
146. **Ducom, P., 1996.** Lutte chimique contre les insectes des grains stockés. In Manuel Post-Récolte : Principes et Applications en zone tropicale. *AUPELF*, p.p. 105-140
147. **Duraffourd, C., D’Hervicourt, L., & Lappraz, J. C., 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Elements thérapeutiques synergiques. 2ème édition Masson (Paris), 87 p.
148. **Ehsani, A., Mahjani, M. G., Hosseini, M., Safari, R., Moshrefi, R., & Shiri, H. M., 2017.** Evaluation of *Thymus vulgaris* plant extract as an eco-friendly corrosion inhibitor for stainless steel 304 in acidic solution by means of electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical noise analysis and density functional theory. *Journal of colloid and interface science*, 490: 444-451.
149. **Eikani, M. H., Golmohammad, F., Mirza, M., & Rowshanzamir, S., 2007.** Extraction of volatile oil from cumin (*Cuminum cyminum* L.) with superheated water. *Journal of food process engineering*, 30(2): 255-266.
150. **EL Lakwah F., 1990.** Fumigation experiments with phosphine in traditional mud silos in Egypt to control stored- product insects. Proceeding 5th international working confetrence on stored-product protection. *Sept. 9-14. Bordeaux*, 2: 799-810.
151. **El Oualidi, J., 1991.** *Biosystematique et taxonomie des Teucrium de la section Polium (Lamiaceae) dans le bassin mediterraneen occidental* (Doctoral dissertation, These de Doctoral Faculte de sciences et techniques du Languedoc).
152. **Ela, M. A., El-Shaer, N. S., & Ghanem, N. B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*, 51(12): 993-994.
153. **El-Ghorab A. H., 2006.** The chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *J. Essential oil Bearing Plants*, 9: 183–195.

154. **El-Nahal, A. K. M., Schmidt, G. H., & Risha, E. M., 1994.** Influence of vapours of *Acorus calamus* L. oil on the reproductivity of some stored-product Coleoptera. *Pakistan Journal of Entomology Karachi (Pakistan)*, 9: 21-27.
155. **Elshafie, H. S., & Camele, I., 2017.** An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Res Int*, 14 p.
156. **Elshafie, H. S., Mancini, E., Camele, I., De Martino, L., & De Feo, V., 2015.** In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products*, 66: 11-15.
157. **Elshafie, H. S., Sakr, S., Mang, S. M., Belviso, S., De Feo, V. & Camele, I., 2016.** “Antimicrobial activity and chemical composition of three essential oils extracted from mediterranean aromatic plants,” *Journal of Medicinal Food*, 19(11): 1096–1103.
158. **Enan, E. E., 2005a.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 59(3): 161-171.
159. **Enan, E. E., 2005b.** Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(4): 309-321.
160. **Enan, E., 2001.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3): 325-337.
161. **Entezari, M. H., Nazary, S. H., & Khodaparast, M. H., 2004.** The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(6): 379-384.
162. **Esmacili, A.M., & Yazdanparast, R., 2004.** Hypoglycaemic effects of *Teucrium Polium*: studies with rat pancreatic islets. *J. Ethnopharmacol.*, 95: 27–30.
163. **Esmaili, M., Vojoudi, S., & Parsaeyan, E., 2013.** Fumigant toxicity of essential oils of *Mentha pulegium* L. on adults of *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricorne* and *Sitophilus oryzae* in laboratory conditions. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(9): 732-735.
164. **Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S., 2015.** Optimisation des paramètres influençant l’hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6(8): 2346-2357.
165. **Fasty, D., 2007.** Ma bible des huiles essentielles. Leduc Editions, 20 p.
166. **Favier, A., 2003.** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique*, p.p. 108-115.
167. **Favier, A., 2006.** Oxidative stress in human disease. *Ann. Biol. Clin.* 64(6): 390-396.
168. **Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A., 2011.** Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2): 1486-1507.

169. **Fertout-Mouri, N., Latrèche, A., Mehdadi, Z., Toumi-Bénali, F., & Khaled, M. B., 2017.** Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15(6): 346-353.
170. **Fichan, I., Larroche, C., & Gros, J. B., 1999.** Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(1): 56-62.
171. **Fine, D. H., Furgang, D., & Barnet, M. L., 2001.** Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.*, 28: 697-700.
172. **Finney, D. J., 1971.** Probit Analysis: 3d Ed: Cambridge University Press.
173. **Foganholi, A. P. A. M., Souza Daniel, J. F., Santiago, D. C., Resges Orives, J., Pinto Pereira, J., & Faria, T. d. J., 2015.** Chemical composition and antifungal activity of pennyroyal essential oil in different stages of development. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(5): 3091-3100.
174. **Fox, C. W., 1994.** The influence of egg size on offspring performance in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Oikos*, p.p. 321-325.
175. **Fraga, C. G., 2010.** Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology. John Wiley, Hoboken, NJ, USA.
176. **Franchomme, P., & Pénoël D., 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur Limoges, 445 p.
177. **Friedman, O., & Leslie, A. M., 2004.** A developmental shift in processes underlying successful belief-desire reasoning. *Cognitive Science*, 28(6): 963-977.
178. **Fujita Y., & Fujita S. I., 1967.** Essential oil of *Mentha pulegium* and *M. grattefossei* view from the standpoint of comparative biochemistry. *Nippon Kagaku Zasshi*, 88: 767-768.
179. **Gaeini, Z., Taghinezhad, M., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Mahdavi, S. M., 2013.** Healthful characteristics of pennyroyal essential oil. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(4): 78-85.
180. **Galadima, M. S., Ahmed, A. S., Olawale, A. S., & Bugaje, I. M., 2012.** Optimization of steam distillation of essential oil of *Eucalyptus tereticornis* by response surface methodology. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 20(4): 368-372.
181. **Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., & Demo, M., 2009.** Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(6): 348-354.
182. **Gamisans, J., & Jeanmonod, D., 1993.** Catalogue des plantes vasculaires de la Corse (seconde édition). Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève, Chambésy, 258 p.
183. **Gerhard, R., 1993.** Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Lavoisier Tec and Doc, p.p. 333-339.

184. **Ghazghazi, H., Chedia, A., Weslati, M., Trakhna, F., Houssine, S., Abderrazak, M., Brahim, H., 2013.** Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activities of *Mentha pulegium* Leaves Extracts against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Safety*, 33(3): 239-246.
185. **Gholivand, M. B., Yamini, Y., & Dayeni, M., 2014.** Optimization and comparison of ultrasound-assisted extraction of estragole from Tarragon leaves with hydro-distillation method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 1(2): 99-107.
186. **Gill, A. O., & Holley, R. A., 2006.** Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 108(1): 1-9.
187. **Girault, M., & Bougeon, J., 1971.** L'aromatogramme. Cahier de biothérapie, n°29.
188. **Glitho, I. A., 1990.** Les Bruchidae ravageurs de *Vigna unguiculata*. en zone guinéenne: Analyse de la diapause reproductrice chez les mâles de *Bruchidius atrolineatus* Pic. Thèse de Doctorat, Université François Rabelais, Tours, 100 p.
189. **Glitho, I. A., Nuto, Y., Attoh, A., Sambena, B., & Kounnou, K., 1988.** Ecologie et biologie de la reproduction des Bruchidae parasites des légumineuses alimentaires cultivées au Togo et au Bénin. Rapport ABN (Biosciences), Lomé, 81p.
190. **González-M, G., Usaquén-Castro, X., Martínez-R, M., & Aya-Baquero, H., 2006.** Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis Vinifera*) Residues. 13th World Congress of Food Science & Technology.
191. **Goulas, V., Gomez-Caravaca, A. M., Exarchou, V., Gerathanassis, I. P., Segura-Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A., 2012.** Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT- Food Science and Technology*, 46(1):104-109.
192. **Granato, D., Katayama, F. C. U., & de Castro, I. A., 2011.** Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129(2): 366-373.
193. **Gregor, D. J. & Gummer, W. D., 1989.** Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian arctic snow. *Environmental Science and technology*, 23: 561-565.
194. **Grubešić, R. J., Vladimir-Knežević, S., Kremer, D., Kalodera, Z., & Vuković, J., 2007.** Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia*, 62(2): 148-156.
195. **Grundy, D. L., & Still, C. C., 1985.** Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1, 2-epoxide. *Pesticide biochemistry and physiology*, 23(3): 383-388.
196. **Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C., 2007.** Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101(4): 1558-1564.
197. **Guenther, E., 1948.** The Essential Oils. D. Van Nostrand Company Inc.; New York, NY, USA, 427 p.
198. **Guignard, J.L., & Dupont F., 2004.** Botanique : Systématique moléculaire, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris, 237 p.

199. **Guignard, J. L., 2000.** Biochimie végétale, Masson Paris, p.p. 215-230.
200. **Guinoiseau, E., 2010.** *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action* (Doctoral dissertation, Université de Corse), 238 p.
201. **Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., & Ozkan, H., 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4): 1449-1456.
202. **Gupta V. K., Pathak A., Siddiqi N. J., & Sharma B., 2016.** Carbofuran modulating functions of acetylcholinesterase from rat brain *in vitro*. *Adv. Biol.* 63:12-17.
203. **Gwinner, J., Harnisch, R. & Muck, O., 1996.** Manual on the prevention of post-harvest grain losses, Ed. GTZ, Germany, 19 p.
204. **Haddouchi, F., Lazouni, H., Ahammer, K. A., Carson CF., & Riley T. V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl. Microbiol.*, 86: 985-990.
205. **Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., & Bakhrouf, A., 2010.** Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9): 2186- 2192.
206. **Hajlaoui, H., Snoussi, M., Jannet, H. B., Mighri, Z., & Bakhrouf, A., 2008.** Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Annals of microbiology*, 58(3): 513-525.
207. **Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R., & Bakhrouf, A., 2009.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12): 2227-2238.
208. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P., 2007.** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10): 628-38.
209. Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52(8): 253-265.
210. **Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6): 985-990.
211. **Hammoudi, R., 2015.** *Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien* (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla), 166 p.
212. **Hammoudi, R., Mahfoud, H. M., & Ould El Hadj, M. D., 2013.** Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Teucrium polium geyrii* (Labiatae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(20): 1506-1510.

213. **Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T., 1998.** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1): 125-129.
214. **Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P., 1999.** Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). London: *Taylor & Francis*.
215. **Harborne, J. B., Tomás-Barberán, F. A., Williams, C. A., & Gil, M. I., 1986.** A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 25(12): 2811-2816.
216. **Hasani, P., Yasa, N., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., & Abdollahi, M., 2007.** In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharm*, 57: 123–129.
217. **Haunold, C., 1991.** Extraction de pyréthrinés : analyse du procédé discontinu et de l'influence des ultrasons, modélisation et mise en œuvre d'un procédé continu. Thèse INP Toulouse.
218. **Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Douar-Latreche, S., 2013.** Effect of heat treatment on the chemical composition and the antioxidant activity of essential oil of *Thymus palleseus* de Noé from Algeria. *Journal of essential oil research*, 25(4): 308-314.
219. **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(3): 714-721.
220. **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10): 572-584.
221. **Heinrich, M., & Teoh, H. L., 2004.** Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3): 147-162.
222. **Hendrich, A. B., 2006.** Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1) : 27 p.
223. **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F., 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1): 3-6.
224. **Hesham, H.A.R., Abdurahman H.N. & Yunus, R.Y., 2016.** Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Aust. J. Basic Applied Sci.*, 10: 117-127.
225. **Heydarzade, A., & Moravvej, G., 2012.** Contact toxicity and persistence of essential oils from *Foeniculum vulgare*, *Teucrium polium* and *Satureja hortensis* against *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) adults (Coleoptera: Bruchidae). *Turkish Journal of Entomology*, 36(4): 509-518.
226. **Hilliard, J. J., Krause, H. M., Bernstein, J. I., Fernandez, J. A., Nguyen, V., Ohemeng, K. A., & Barrett, J. F., 1995.** A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. In *Antimicrobial Resistance*. Springer, Boston, MA, p.p. 59-69.

227. **Hollman, P. H., & Katan, M. B., 1999.** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10): 937-942.
228. **Hrdina P. D., Singhal R. L. & Ling G. M., 1975.** DDT and Related Chlorinated Hydrocarbon Insecticides: Pharmacological Basis of Their Toxicity in Mammals, *Advances in Pharmacology*, 12: 31–88.
229. **Hromadkova, Z., Ebringerova, A., & Valachovič, P., 2002.** Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 9(1): 37-44.
230. **Huang, H. C., & Lin, J. K., 2012.** Pu-erh tea, green tea, and black tea suppresses hyperlipidemia, hyperleptinemia and fatty acid synthase through activating AMPK in rats fed a high-fructose diet. *Food Funct.*, 3: 170-7.
231. **Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J., 2008.** Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food chemistry*, 114(3): 1147-1154.
232. **Huang, Z. A., Jiang, D. A., Yang, Y., Sun, J. W., & Jin, S. H., 2004.** Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica*, 42(3): 357-364.
233. **Hubert, R., 1998.** Biochimie de l'aliment, acides aminés et oligopeptides ENSIA.
234. **Hurtel, J. M., 2006.** Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.
235. **Hüsni, C. B. K., & Buchbauer, G., 2010.** Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application. Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS., 121 p.
236. **Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., Rahu, N., 2016.** Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 9 p.
237. **Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M., 2011.** Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular aspects of medicine*, 32(4-6): 234-246.
238. **Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F., & Senatore, F., 2005.** Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1): 57-61.
239. **Iloki-Assanga, S. B., Lewis-Lujan, L. M., Lara-Espinoza, C. L., Gil-Salido, A. A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J. L., & Haines, D. D., 2015.** Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes*, 8: 396-407.
240. **Irshad, S., Mahmood, M., & Perveen, F., 2012.** In vitro antibacterial activities of three medicinal plants using agar well diffusion method. *Research journal of Biology*, 2(1): 1-8.
241. **Isman, M. B., 1994.** Botanical insecticides. *Pesticide Outlook*, 5(3): 26-26.
242. **Isman, M. B., 2000.** Plant essential oils for pest diseases management. *Crop Protection*, 19: 603-608.

243. **Isoda, H., Motojima, H., Onaga, S., Samet, I., Villareal, M. O., & Han, J., 2014.** Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. *Chemico-biological interactions*, 220: 269-277.
244. **Jackai, L. E. N., & Daoust, R. A., 1986.** Insect pests of cowpeas. *Annual review of entomology*, 31(1): 95-119.
245. **Jacobsen, M., 1989.** Botanical pesticides past, present, and future. In: insecticide of Plant Origin. *ACS Symposium Series*, 387: 1-10.
246. **Jahandiez, E., & Marie, R., 1934.** Catalogue des Plantes du Maroc, 3: 662 p.
247. **Kabouche, A., Kabouche, Z., Ghannadi, A., & Sajjadi, S. E., 2007.** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from Algeria. *Journal of essential oil Research*, 19(1): 44-46.
248. **Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Aitkaki, Z., & Benlabed, K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3): 129-133.
249. **Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R., 2011.** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10(19): 3908-3914.
250. **Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10): 813-829.
251. **Kamali, H., Aminimoghadamfarouj, N., Golmakani, E., & Nematollahi, A., 2015.** The optimization of essential oils supercritical CO₂ extraction from *Lavandula hybrida* through static-dynamic steps procedure and semi-continuous technique using response surface method. *Pharmacognosy research*, 7(1): 57-68.
252. **Kamel, A., & Sandra, P., 1994.** Gas chromatography—mass spectrometry analysis of the volatile oils of two *Teucrium polium* varieties. *Biochemical systematics and ecology*, 22(5): 529-532.
253. **Kamkar, A., Javan, A. J., Asadi, F., & Kamalinejad, M., 2010.** The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7): 1796-1800.
254. **Karousou R., Koureas D.N. & Kokkini S., 2005.** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, 66: 2668-2673.
255. **Kawashty S. A., Gamal El-Din E. M., & Saleh N. A. M., 1997.** The favonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 657-660.
256. **Keane, S., & Ryan, M. F., 1999.** Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(12): 1097-1104.
257. **Keita, S.M., Vincent, C., Schmit, J.P. & Arnason, J.T., 2001.** Insecticidal effet of *Thudja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Plant Science*, 81(1): 173 -177.
258. **Kellner, W., & Kober, W., 1954.** Möglichkeiten der verwendung atherischer ole zur raumdesinfektion. 1. Die wirkung gebräuchlicher atherischer ole auf testkeime. *Arzneimittel-forschung-drug research*, 4(5): 319-325.

259. **Kellouche A., Ait-Aider F., Labdaoui K., Moula D., Ouendi K., Hamadi N., Ouramdane A., Frerot B. & Mellouk M., 2010.** Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Integrative Biology*, 10(2): 86-93.
260. **Kellouche, A., & Soltani, N., 2004.** Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* (F.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 24(2): 184-191.
261. **Kellouche, A., 2005.** Etude de la bruche du poi-chiche, *Callosobruchus muculatus* (Coleoptera: bruchidae): Biologie, physiologie, reproduction et lutte. *Thèse Doctorat d'état en entomologie. Univ. Tizi-ouzou, Algérie.*
262. **Kergoat, G. J., Silvain, J. F., Delobel, A., Tuda, M., & Anton, K. W., 2007.** Defining the limits of taxonomic conservatism in host-plant use for phytophagous insects: Molecular systematics and evolution of host-plant associations in the seed-beetle genus *Bruchus* Linnaeus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1): 251-269.
263. **Ketoh, G. K., Glitho, I. A., Nuto, Y., & Koumaglo, H. K., 1998.** Effets de six huiles essentielles sur les œufs et les larves de *callosobruchus maculatus* F. (coleoptera: bruchidae). *Revue CAMES, Série. Sciences et Médecine*, p.p.16-20.
264. **Khan, S., Taning, C. N. T., Bonneure, E., Mangelinckx, S., Smagghe, G., & Shah, M. M., 2017.** Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects. *Phytoparasitica*, 45(1): 113-124.
265. **Khater, H. F., 2012.** Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacologia*, 3(12): 641-656.
266. **Khettaf, A., Belloula, N., & Dridi, S., 2016.** Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of some wild medicinal plants in southeastern Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 15(13): 524-530.
267. **Khorasani Esmaeili, A., Mat Taha, R., Mohajer, S., & Banisalam, B., 2015.** Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *Biomed Res Int*, 6(4): 72-85.
268. **Khosravi, M., Mortazavi, S. A., Karimi, M., Sharayie, P., & Armin, M., 2013.** Comparison of ultrasound assisted and Kelavenger extraction methods on efficiency and antioxidant properties of Fennel's oil essence and its optimization by response surface methodology. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(21): 2521-2528.
269. **Kim, S.-I., Roh, J.-Y., Kim, D.-H., Lee, H.-S., & Ahn, Y.-J., 2003.** Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored products research*, 39(3): 293-303.
270. **King, A., & Young, G., 1999.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99: 213-218.
271. **Koehlin-Ramonatxo, C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4): 165-177.

272. **Kokkini, S., Handilou, E., Karousou, R., & Lanaras, T., 2002.** Variations of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *J. Essent. Oil Res.*, 14: 224-227.
273. **Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., & Lanaras, T., 1997.** Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44(5): 883-886.
274. **Kordali, S., Kesdek, M., & Cakir, A., 2007.** Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Industrial Crops and Products*, 26(3): 278-297.
275. **Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., & Shaaya, E., 2002.** Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science*, 58(11): 1101-1106.
276. **Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M., 2004.** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4): 633-640.
277. **Kurtoğlu, C., & Tğn, B., 2017.** Essential Oil Composition of *Teucrium polium* L. Grown in Aydın/Turkey. *Turkish Journal of Life Sciences*, 2(1):142-144
278. **Kusuma, H.S., & Mahfud, M., 2016.** Response surface methodology for optimization studies of microwave-assisted extraction of sandalwood oil. *J. Mater. Environ. Sci.*, 7: 1958-1971.
279. **Lagnika, L., 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, Thèse Doctorat en Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
280. **Lahlou, M., 2004a.** Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and fragrance journal*, 19(2): 159-165.
281. **Lahlou, M., 2004b.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research*, 18(6): 435-448.
282. **Lamaison, J. L. C., & Carnet, A., 1990.** Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 65: 315-320.
283. **Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3): 453-462.
284. **Lardry, J. M., & Haberkorn, V., 2007.** Les Huiles Essentielles: principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews*, 61: 18-23.
285. **Laub, G. R., 1986.** Discovery of the sulfa drugs. *South Med.*, 79: 782-789.
286. **Lawrencet B., M., 2000.** Essential oils: from agriculture to chemistry. *J.Aromatherapy*, 10: 82-98.
287. **Le Man, H., Behera, S. K., & Park, H. S., 2010.** Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(1): 157-164.
288. **Lee, B. H., Lee, S. E., Annis, P. C., Pratt, S. J., Park, B. S., & Tumaalii, F., 2002.** Fumigant toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5(2): 237-240.

289. **Lee, B., Choi, W., Lee, S. & Park, B., 2001.** Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection*, 20: 317-320.
290. **Lee, S., Peterson, C. J., & Coats, J., 2003.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 39(1): 77-85.
291. **Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B., 2014.** Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12): 6020-6047.
292. **Li, D., Li, B., Ma, Y., Sun, X., Lin, Y., & Meng, X., 2017.** Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62: 84-93.
293. **Li, Y., A.S. Fabiano-Tixier & F. Chemat, 2014.** Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. In: *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Springer International Publishing, p.p. 9-20.
294. **Liang, Y. Z., Xie, P., & Chan, K., 2004.** Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B*, 812: 53-70.
295. **Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn.Rev.*, 4(8):118–126.
296. **Lograda, T., Ramdani, M., Chalard, P., Figueredo, G., & Deghar, A., 2014.** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Eastern Algeria. *Open Journal of Advanced Drug Delivery*, 2(6): 697-710.
297. **Loni, A., & Panahi, O., 2014.** Control of stored grain pest, *Callosobruchus maculatus*(F.) (Coleoptera: Bruchidae), using the essential oils isolated from *Zingiber officinale*(L.) and *Mentha pulegium* (L.) in laboratory condition. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 48(5): 434-440.
298. **López, M., & Pascual-Villalobos, M., 2010.** Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31(2): 284-288.
299. **Lopez-Romero, J. C., Gonzalez-Rios, H., Borges, A., & Simoes, M., 2015.** Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 7: 85-93.
300. **Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies P., Vila R., & Cañigüeral, S., 2002.** Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 45(2): 519-524.
301. **Lucchesi ME., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., & Chemat F., 2007.** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food .Engineer.*, 79: 1079-1086.

302. **Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J., 2004a.** Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*, 1043(2): 323-327.
303. **Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J., 2004b.** An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices». *Flavour. Fragr. J.*, 19: 134-138.
304. **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C., 2005.** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* PPUR presses polytechniques.
305. **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Sarni-Manchado, P., 2006.** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaire. Coordonnatrices Sarni-Manchado P et Cheynier V, TEC et DOC.(Eds), Lavoisier, Paris*, p.p. 390-399.
306. **Maddox, C. E., Laur, L. M., & Tian, L., 2010.** Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current microbiology*, 60(1): 53.
307. **Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K., 1996.** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. *Marcel Dekker, Inc. New York*, 65 p.
308. **Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B., 2015.** Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front Microbiol*, 6: 165-173.
309. **Magliulo, E., Carosi, P.G., & Minoli, L., 1973.** Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneim. Forsch.*, 23: 161-167.
310. **Mahboubi, M., & Hagi, G., 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol*, 119(2): 325-327.
311. **Mahmoudvand, M., Abbasipour, H., Basij, M., Hosseinpour, M. H., Rastegar, F., & Nasiri, M. B., 2011.** Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored-product pests. *Chilean journal of agricultural research*, 71(1): 83-91.
312. **Mainya N. O., Tum, P. & Douglas, R. M., 2016.** Optimization of essential oil extraction from eucalyptus grandis leaves by clevenger distillation. *International Journal of Science and Research* , 5(7): 493-496.
313. **Manach, C., Regerat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., & Remesy, C., 1996.** Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, 16: 517-544.
314. **Manach, C., Scalbert, A., Remesy, C., & Morand, C., 2006.** Consommation et biodisponibilité des polyphénols. *Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier*, p.p. 361-390.
315. **Mann, R. S., Tiwari, S., Smoot, J. M., Rouseff, R. L., & Stelinski, L. L. 2011.** Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *J. Appl. Entomol.*, 136: 87-96.

316. **Mansour, F., Ravid, U. & Putievsky, E., 1986.** Studies of the effects of the essential oils isolated from 14 species of Labiate on the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. *Phytoparasitica*, 14: 137-142.
317. **Marais, J. P., Deavours, B. E. T. T. I. N. A., Dixon, R. A., & Ferreira, D., 2007.** The Stereochemistry of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold, Ed. *Springer*, p.p.1-46.
318. **Marfak, A., 2003.** *Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Limoges), 181p.
319. **Marino, M., Bersani, C., & Comi, G., 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International journal of food microbiology*, 67(3): 187-195.
320. **Marino, S.D., Festa, C., Zollo, F., Incollongo, F., Raimo, G., Evangelista, G., & Iorizzi, M., 2012.** Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133(1): 21-28.
321. **Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N., 2009.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116(1): 306-312.
322. **Marmonier, A. A., 1990.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. *Bactériologie Médicale, technique usuelles*, p.p. 227-236.
323. **Martin, M.J., Marhuenda, E., & Perez-Guerrero, C., 1994.** Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, 49(3): 144-50.
324. **Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W., 2012.** A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11(1): 83-89.
325. **Marzouk, B., Fredj, M. B. H., Chraief, I., Mastouri, M., Boukef, K., & Marzouk, Z., 2008.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal Of Food Agriculture And Environment*, 6(1): 78-86.
326. **Masomi, F., & Hassanshahian, M., 2016.** Antimicrobial Activity of Five Medicinal Plants on *Candida Albicans*. *Iranian Journal of Toxicology*, 10(6): 39-43.
327. **Mason, J. R., 1990.** Evaluation of d-pulegone as an avian repellent. *The Journal of Wildlife Management*, p.p. 130-135.
328. **Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira J. M. F., & Araújo M. E. M., 2007.** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.*, 103: 778-786.
329. **Matasyoh, L. G., Matasyoh, J. C., Wachira, F. N., Kinyua, M. G., Muigai, A. W. T., & Mukiyama, T. K., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology*, 6(6): 760-765.
330. **Mediouni Ben Jemâa J., Tersim N., Taleb Toudert K. & Larbi Khoudja M., 2012.** Insecticidal activities of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and

- Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*, 48: 97-104.
331. **Meena, M. R., & Sethi, V. I. J. A. Y., 1994.** Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of food science and technology. Mysore*, 31(1): 68-70.
332. **Mei, X. Y., Kitamura, Y., Takizawa, K., Kikuchi, A., & Watanabe, K., 2014.** Pretreatment and distilling processes of Eucalyptus globulus leaves for enhancing essential oil production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(4): 285-292.
333. **Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., & Philosoph-Hadas, S., 1995.** Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(7): 1813-1819.
334. **Menea, F., Menna, A., & Tréton, J., 2014.** Polyphenols against skin aging in polyphenols in human health and disease, *pharmaceutica analytica acta.*, 1: 819-830.
335. **Meriga, B., Mopuri, R., & MuraliKrishna, T., 2012.** Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(5): 391-395.
336. **Messaili, B. 1995.** Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed). Alger, 91p.
337. **Meyer, J. A., Disch, D., Cruthers, L. R., Slone, R. L., & Endris, R. G., 2003.** Repellency and efficacy of a 65% permethrin spot-on formulation for dogs against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Vet. Ther.*, 4: 135-144.
338. **Meyer, S., Reeb, C., & Bosdeveix, R., 2004.** Botanique Biologie et Physiologie Végétales. Editions Maloine, Paris.
339. **Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4): 673-751.
340. **Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., & Lüthje, S., 2004.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2): 173-193.
341. **Miladi, H., Slama, R. B., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E., 2013.** Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat. Sci.*, 5(6): 729-739.
342. **Milane H., 2004.** La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. These de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p.
343. **Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., & Matavulj, M., 2003.** Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, 69(05): 413-419.
344. **Mkaddem, M., Bousaid, M., & Ben Fadhel, N., 2007.** Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 19: 211-215.

345. **Mnayer, D., A.S. Fabiano-Tixier, E. Petitcolas, K. Ruiz, T. Hamieh & F. Chemat, 2017.** Extraction of green absolute from thyme using ultrasound and sunflower oil. *Resour.-Efficient Technol.*, 3: 12-21.
346. **Moghtader, M., 2009.** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. *American-Eurasian J, Agric, & Environ, Sci.*, 5(6): 843-846.
347. **Möller, K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. *Editorial UNICO*, 152 p.
348. **Montgomery, D. C., 2005.** Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
349. **Morsy, N.F., 2015.** A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Ind. Crops Prod.*, 65: 287-292.
350. **Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M., 2017.** Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2): 361-366.
351. **Motamedi, H., Seyyednejad, M., Dehghani, F., & Hasannejad, Z., 2014.** Investigation of Antibacterial Activity of Ethanolic and Methanolic Extracts of *Mentha pulegium* L. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(10): 55-59.
352. **Mouhouche, F., 2005.** Identification des facteurs de la sensibilité variétale du pois chiche aux attaques d'un ravageur de stockage adapte *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae) et non adapte *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae).
353. **Muanda, F. N., 2010.** Identification de Polyphenols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz, 239 p.
354. **Mudzengi, C. P., Murwira, A., Tivapasi, M., Murungweni, C., Burumu, J. V., & Halimani, T., 2017.** Antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of selected species used in livestock health management. *Pharm Biol*, 55(1): 1054-1060.
355. **Mukazayire, M. J., Tomani, J. C., Stévigny, C., Chalchat, J. C., Conforti, F., Menichini, F., & Duez, P., 2011.** Essential oils of four Rwandese hepatoprotective herbs: Gas chromatography–mass spectrometry analysis and antioxidant activities. *Food chemistry*, 129(3): 753-760.
356. **Multon, J. L., 2002.** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, Paris, Lavoisier, p.p. 207-231.
357. **Muruganandam, L., Krishna, A., Reddy, J., & Nirmala, G. S., 2017.** Optimization studies on extraction of phytochemicals from betel leaves. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4): 385-393.
358. **Myer, R. H., & Montgomery, D. C., 2002.** Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment. *John Wiley and Sons, New York*, 97(460): 1216 p.
359. **Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Fazelian, M., & Eslami, B., 2009.** In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of

- Diospyros lotus and Pyrus boissieriana growing in Iran. *Pharmacognosy magazine*, 5(18): 122-129.
360. **Nabi, N. G., & Shrivastava, M., 2017.** Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Psoralea corylifolia seeds. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 5(2): 01-07.
361. **Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi, M.S., & Ghorbani, A., 2005.** Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2: 63-79.
362. **Nakakita, H. & Winks, R. G., 1981.** Phosphine resistance in immature stages of a laboratory selected strain of Tribolium castanum (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 17: 43-52.
363. **Nattudurai, G., Baskar, K., Paulraj, M. G., Islam, V. I. H., Ignacimuthu, S., & Duraipandiyar, V., 2017.** Toxic effect of Atalantia monophylla essential oil on Callosobruchus maculatus and Sitophilus oryzae. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2): 1619-1629.
364. **Nauciel, C., & Vildé, J.L., 2005.** Bactériologie médicale. 2èmeEd. Masson, Paris, p.p. 5-10.
365. **Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V., 2013.** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12): 1451-1474.
366. **Ndomo A.F. & Ngamo L.T., 2008.** Insecticidal effects of the powdery formulation based on clay and essential oil from the leaves of Clausena anisata (W.) J. D. Hooks ex. Benth. (Rutaceae) against Acanthoscelides obtectus (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Pest Science*, 81: 227-234.
367. **Ndomo, A. F., Tapondjou, A. L., Tendonkeng, F., & Tchouanguép, F. M., 2009.** Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de Callistemon viminalis (Myrtaceae) contre les adultes d'Acanthoscelides obtectus (Say) (Coleoptera : Bruchidae). *Tropicultura*, 27(3), 137-14.
368. **Ndoutoume-Ndong, A., & Rojas-Rousse, D., 2007.** Y at-il élimination d'Eupelmus orientalis Crawford par Eupelmus villeti Crawford (Hymenoptera: Eupelmidae) des systèmes de stockage du niébé (Vigna unguiculata Walp)? In *Annales de la Société entomologique de France . Taylor & Francis Group*, 43(2): 139-144.
369. **Newman, D., Cragg, G. & Snader, K., 2003.** Natural products as source of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.*, 66: 1022-1037.
370. **Ngamo, L. S. T., & Hance, T. H., 2007.** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicultura*, 25(4): 215-220.
371. **Ngassapa, O., Runyoro, D. K., Harvala, E., & Chinou, I. B., 2003.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian Lippia javanica (Burm. f.) Spreng.(Verbenaceae). *Flavour and fragrance journal*, 18(3): 221-224.
372. **Ngo, T. V., Scarlett, C. J., Bowyer, M. C., Ngo, P. D., & Vuong, Q. V., 2017.** Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of Salacia chinensis L. *Journal of Food Quality*, 1-8.

373. **Nicklin, J., Graeme, K-Cook., Paget, RT., & Killingtons, R., 2000.** Essentiel en microbiologique. Berti édition. Paris, 375 p.
374. **Nie, S. P., Li, J. E., Yang, C., Qiu, Z. H., & Xie, M. Y., 2010.** Optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from herba moslae by response surface methodology and its chemical composition analysis. *Food science and technology research*, 16(3): 185-190.
375. **Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A., 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications-. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4): 418-425.
376. **Nikpay, A., 2006.** Diatomaceous earths as alternatives to chemical insecticides in stored grain. *Insect science*, 13(6): 421-429.
377. **Nyamador, S. W., Mond, edji, A. D., Kassaney, B. D., Ketoh, G. K., Koumaglo, H., K, & Glitho, I. A., 2017.** Insecticidal activity of four essential oils on the survival and oviposition of two sympatric bruchid species: *Callosobruchus maculatus* F. and *Callosobruchus subinnotatus* PIC.(Coleoptera: Chrysomelidea: Bruchinae). *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 8(9): 103-112.
378. **Oganesyan G.B., Galstyan A.M., Mnatsakanyan V. A., Shashkov A.S., & Gababyan P.V., 1991.** Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural Compound*, 27: 556-559.
379. **Ogunwolu, E. O., & Odunlami, A. T., 1996.** Suppression of seed bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.) development and damage on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) with *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterm.(Rutaceae) root bark powder when compared to neem seed powder and pirimiphos-methyl. *Crop protection*, 15(7): 603-607.
380. **Onawunmi, G. O., 1989.** Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett Appl Microbiol.*, 9: 105-108.
381. **Ong, K.C., & Khoo, H.E., 1997.** Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmacol.*, 29 (2): 121-6.
382. **Ouakouak, H., Chohra, M., & Denane, M., 2015.** Chemical composition, antioxidant activities of the essential oil of *Mentha pulegium* L, South East of Algeria. *International Letters of Natural Sciences*, 39: 49-55.
383. **Ouedraogo, P. A., 1991.** *Le déterminisme du polymorphisme imaginal chez Callosobruchus maculatus (Fab.), Coléoptère Bruchidea. Importance des facteurs climatiques sur l'évolution des populations de ce Bruchidae dans un système expérimental de stockage de graines de Vigna unguiculata (Walp.)*. Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Abidjan, 117 p.
384. **Ouedraogo, P. A., Sou, S., Sanon, A., Monge, J. P., Huignard, J., Tran, B., & Credland, P. F., 1996.** Influence of temperature and humidity on populations of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Pteromalidae) in two climatic zones of Burkina Faso. *Bulletin of Entomological Research*, 86(6): 695-702.

385. **Oumzil, H., Ghouami, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., & Benjouad, A., 2002.** Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, 16(8) : 727-731.
386. **Oussou, K.R., 2009.** Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
387. **Oussou, K.R., Youlou, S., Kanko, C., Tue Bi, B., Kanko, C., Boti, J.B., Ahibo, C. & Casanova, J., 2010.** Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*, 1: 50-59.
388. **Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
389. **Ozenda, P., 1977.** Flore du Sahara (Deuxième édition revue et complétée). *CNRS, Paris*.
390. **Padalia, H, Poptani, R, & Chanda, S., 2017.** Evaluation of in Vitro Antioxidant Properties of Solvent Extracts of Selected Medicinal Plants and Their Synergistic Efficacy. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, p.p.1-13.
391. **Pandini, J, da Silva Pinto, G, Scur, M, Angeli, Alves, L, & Castilho Martins, C., 2015.** Antimicrobial, insecticidal and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea Kunthiana* A. Juss. *J Med Plants Res.*, 9: 48–55.
392. **Panovska, T. K., Kulevanova, S., Gjorgoski, I., Bogdanova, M., & Petrushevska, G., 2007.** Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharm*, 57: 241-248.
393. **Parsae, H., & Shafiee-Nick, R., 2006.** Anti-spasmodic and ant nociceptive, Effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iranian Biomedical Journal*, 10(3): 145–149.
394. **Pascual-Villalobos, M. J., & Ballesta-Acosta, M. C., 2003.** Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(7): 673-679.
395. **Pauli, A., 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather*, 11: 126-133.
396. **Pavela, R., 2011.** Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. *Industrial Crops and Products*, 34(1): 888-892.
397. **Pavithra, K., & Vadivukkarasi, S., 2015.** Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*, 4(1): 42-46.
398. **Pellerin P., 2001.** Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim. V.*, 94: 51-62.
399. **Penoel D., 1994.** La médecine aromatique. *Research. Mediterranea*, 1: 24-29.

400. **Perruci S., Mancianti F., Cioni P L., Famini G., Morelli I., & Macchioni G., 1994.** In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *microsporium canis* and *microsporium gypseum*. *Planta Med*, 60: 184-187.
401. **Pharmacopée européenne, 2002.** 4^{ème} édition, Strasbourg Conseil de l'Europe.
402. **Philogene B. J. R., 2005.** Effets non intentionnels des pesticides organiques de synthèse: impact sur les écosystèmes et la faune. Dans : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, p.p. 171-187.
403. **Pietta, P. G., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7): 1035-1042.
404. **Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Limet, R., & Defraigne, J. O., 2001.** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act Med Int*, 4: 18-23.
405. Piquet, M. A., & Hébuterne, X., 2007. *Nutrition en pathologie digestive*. Doin, p.p.16-20.
406. **Pistrick, K., 2002.** Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the families' Umbelliferae and Labiatae. *Genetic resources and crop evolution*, 49(2): 211-221.
407. **Politeo, O., Jukić, M., & Miloš, M., 2006.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica chemica acta*, 79(4): 545-552.
408. **Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S., 2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1163: 2-24.
409. **Prates, H. T., Santos, J. P., Waquil, J. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., & Foster, J. E., 1998.** Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 34(4): 243-249.
410. **Prescott, L. M., Harley, D. K., & Klein, E., 1995.** Les microorganismes et l'environnement. Dixième partie. In : Microbiologie. Second edition. DeBoeck Wesmael S.A. Bruxelles, p.p. 804-845.
411. **Price, D. N., & Berry, M. S., 2006.** Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *Journal of insect physiology*, 52(3): 309-319.
412. **Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M., 2006.** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95: 44– 52.
413. **Prowse, G. M., Galloway, T. S., & Foggo, A., 2006.** Insecticidal activity of garlic juice in two dipteran pests. *Agricultural and Forest Entomology*, 8(1): 1-6.
414. **Puškárová, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D., & Kozics, K., 2017.** The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific reports*, 7(1): 8211-8218.
415. **Qasim, M., Aziz, I., Rasheed, M., Gul, B., & Khan, M.A., 2016.** Effect of extraction solvents on polyphenols and antioxidant activity of medicinal halophytes. *Pakistan Journal of Botany*, 48: 621–627

416. **Quezel, P. & S. Santa, 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Desertiques Meridionales. 2nd Edn., Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France, 783 p.
417. **Rajashekar, Y., Bakthavatsalam, N., & Shivanandappa, T., 2012.** Botanicals as Grain Protectants. *Psyche: A Journal of Entomology*, p.p. 1-13.
418. **Rajasimman, M., Sangeetha, R. & Karthik, P., 2009.** Statistical optimization of process parameters for the extraction of chromium (VI) from pharmaceutical wastewater by emulsion liquid membrane. *Chemical Engineering Journal*, 150: 275-279.
419. **Rajurkar, N. S., & Hande, S. M., 2011.** Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(2): 146-158.
420. **Raman, S. T., Ganeshan, A. P., Chen, C., Jin, C., Li, S. H., Chen, H.J., & Gui, Z., 2016.** In vitro and In vivo antioxidant activity of flavonoid extracted from mulberry fruit (*Morus alba* L.). *Phcog Mag.*, 12: 128-33.
421. **Rana, B.K., Singh, U.P. & Taneja, V., 1997.** Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.*, 57: 29-34.
422. **Ranitha, M., Nour, A. H., Ziad, A. S., Azhari, H. N., & Thana Raj, S., 2014.** Optimization of microwave assisted hydrodistillation of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) using response surface methodology. *Int J Res Eng Technol*, 3: 5-14.
423. **Rasekh, H. R., Khoshnood-Mansourkhani, M. J., & Kamalinejad, M., 2001.** Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, 72(8): 937-939.
424. **Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, 2008.** Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles.
425. **Rees, D. P., 1996.** Coleoptera. Integrated Management of Insects in Stored Products (ed. by B Subramanyam & DW Hagstrum). Marcel Dekker, New York, NY, USA, p.p. 1-40.
426. **Regnault Roger C., 2005.** Enjeux Phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Ed Lavoisier, p.p. 20-43.
427. **Regnault-Roger, C., & Hamraoui, A., 1997.** Lutte contre les insectes phytophages par les plantes aromatiques et leurs molécules allélochimiques. *Acta botanica gallica*, 144(4): 401-412.
428. **Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., & Vincent, C., 2008.** *Biopesticides of plant origin* (No. Ed. 2). Editions Tec & Doc.
429. **Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bateau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M. I., & Barberan, F. T., 2004.** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4): 395-408.
430. **Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O., & Regeat, F., 1996.** Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.*, 32(1): 17-27.

431. **Rezzoug, S. A., 2009.** Optimization of steam extraction of oil from maritime pine needles. *Journal of wood Chemistry and Technology*, 29(2): 87-100.
432. **Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifano, F., Burini, G., & Curini, M., 2005.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 98(1-2): 195-200.
433. **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7): 933-956.
434. **Richard, F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc, p.p. 1228-1242.
435. **Richter, E. D., 2002.** Acute human pesticide poisonings. *Encyclopedia of pest management*, p.p. 3-6.
436. **Righi, A.F., Righi, K., Khelil, M.A. & Pujade-Villar, J., 2014.** Biological control against the cowpea weevil (*Callosobruchus chinensis* L., Coleoptera : Bruchidae) using essential oils of some medicinal plants. *Journal of Plant Protection Research*, 54(3): 211- 216.
437. **Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W., 1999.** Phenolic compound and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4): 401-436.
438. **Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I., 2013.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial crops and products*, 44: 437-445.
439. **Rodrigues, L., Póvoa, O., Teixeira, G., Figueiredo, A. C., Moldão, M., Monteiro, A., 2013.** Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 43: 692-700.
440. **Romdhane, M., & Gourdon, C., 2002.** Investigation in solid-liquid extraction : influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87: 11-19.
441. **Rousseau, J. M., Rüttimann, M. & Brinquin, L., 2000.** Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 19(8): 588–598.
442. **Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P. & Carnacini, A., 1998.** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare*ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3741-3746.
443. **Ryan, M. F., & Byrne, O., 1988.** Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of chemical ecology*, 14(10): 1965-1975.
444. **Sabzeghabaie, A., & Asgarpanah, J., 2016.** Essential oil composition of *Teucrium polium* L. fruits. *Journal of Essential oil Research*, 28(1): 77-80.
445. **Sadeghi, Z., Valizadeh, J., Shermeh, O. A., & Akaberi, M., 2015.** Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(1): 1-9.

446. **Safaryan, J., M., Ganjloo, A., Bimakr, M., & Zarringhalami, S., 2016.** Optimization of ultrasound-assisted extraction, preliminary characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from green pea pods. *Foods*, 5(4): 78-87.
447. **Şahin, F., Karaman, I., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., Adıgüzel, A., & Kotan, R., 2003.** Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of ethnopharmacology*, 87(1): 61-65.
448. **Saint, L.D.J.Y., Frérot, E. & Herrmann, A., 2003.** Controlled release of perfumery alcohols by neighboring-group participation. Comparison of the rate constants for the alkaline hydrolysis of 2-acyl-, 2-(hydroxymethyl)-, and 2-carbamoylbenzoates; *Helvetica Chimica Acta*, 86: 2871-2899.
449. **Sakurai, T., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Kizaki, K., Kondoh, Y., Izawa, T., Ishida, H., Radák, Z., & Ohno, H., 2010.** Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem.*, 21: 47-54.
450. **Salem, N., Bachrouch, O., Sriti, J., Msaada, K., Khammassi, S., Hammami, M., & Marzouk, B., 2018.** Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *International Journal of Food Properties*, 20(3): 2899-2913.
451. **Sanon, A., Sou, S., Dabire, L. C. B., Ouedraogo A. P. & Huignard J., 2005.** Combining *Boscia senegalensis* Lam. (Capparaceae) leaves and augmentation and the larval parasitoid *Dinarmus basalis* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) for bruchids control in stored cowpea. *Journal of Entomology*, 2(1): 40-45.
452. **Santos, F. S. R., & Novales M. G. M., 2012.** Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.*, 23: 136-41.
453. **Santos, H. M., Lodeiro, C., & Capelo-Martinez, J. L., 2009.** The Power of Ultrasound. Ultrasound in chemistry: Analytical Applications. Edited by José-Luis Capelo-Martinez, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 171 p.
454. **Sarikurkcu, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A., & Mete, E., 2012.** Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. from Turkey. *Spectroscopy Letters*, 45(5): 352-358.
455. **Scalbert, A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3883.
456. **Schmidt, G. H., Risha, E. M., & El-Nahal, A. K. M., 1991.** Reduction of progeny of some stored-product Coleoptera by vapours of *Acorus calamus* oil. *Journal of Stored Products Research*, 27(2): 121-127.
457. **Seddik, K., Dalila, B., Saliha, D., Saliha, D., Smain, A., Nouredine, C., Abderahmane, B., Daoud, H., & Lekhmici, A., 2013.** Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria chamomilla* L. *Pharmacognosy Communications*, 3(2): 35-40.
458. **Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F., 2004.** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A.*, 1052: 237-240.

459. **Senatore, F., 1996.** Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1327-1332.
460. **Sevindik, E., Yamaner, Ç., Kurtoğlu, C., & Betül, T. İ. N., 2017.** Chemical Composition of *Mentha spicata* L. subsp. *tomentosa* and *M. pulegium* L., and their Antimicrobial Activity on Strong Pathogen Microorganisms. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1): 73-76.
461. **Shaaya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J. & Sukprakan, C., 1997.** Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33: 7-15.
462. **Shahdadi, F., Mirzaei, H. O., & Garmakhany, A. D., 2015.** Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *Journal of food science and technology*, 52(3): 1814-1819.
463. **Shahidi, F., & Naczk, M., 1995.** Food Phenolics. *Technomic pub. Co. Inc. Lancaster-Basel*.
464. **Shahriar, M., Hossain, M. I., Sharmin, F. A., Akhter, S., Haque, M. A., & Bhuiyan, M. A., 2013.** In Vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Withania Somnifera* root. *Iosr Journal of Pharmacy*, 3(2): 38-47.
465. **Shariffar, F., Dehghan-nudeh, G. H., Mirtajaldini, M., 2009.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112: 885-888.
466. **Shi, M., 2012.** Individual-based modelling of the efficacy of fumigation tactics to control lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) in stored grain. *Journal of Stored Products Research*, 51: 23–32.
467. **Shih, C. M., Lin, H., Liang, Y. C., Lee, W. S., Bi, W. F., & Juan, S. H., 2004.** Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *European journal of pharmacology*, 496(1-3): 41-48.
468. **Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D., 2007.** Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22): 225-232.
469. **Siabi, K. M., 1996.** Activité reproductrice de *Callosobruchus maculatus* (Coléoptera : Bruchidae) sur deux variétés de niébé (*Vigna unguiculata* Walp.) : Impact sur la valeur marchande du niébé au Togo. *Mémoire d'Ingénieur des Travaux Université du Bénin*, 53p.
470. **Sikkema, J, De Bont, JAM, & Poolman, B, 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, 11: 8022–8028
471. **Silva, L. F., das Graças Cardoso, M., Batista, L. R., de Souza Gomes, M., Rodrigues, L. M. A., Rezende, D. A. d. C. S., Teixeira, M. L., Carvalho, M. S. S., de Andrade Santiago, J., & Nelson, D. L., 2015.** Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L.(L). *American Journal of Plant Sciences*, 6(5): 666-677.
472. **Singh S. B., & Barrett J. F., 2006.** Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.*, 71: 1006-1015.

473. **Singh, S., Das, S. S., Singh, G., Schuff, C., de Lampasona, M. P., & Catalán, C. A., 2014.** Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *BioMed research international*, p.p. 1-10.
474. **Singleton, V. L., Ortofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology*. Orlando. Academic Press.
475. **Sipailiene, A., Venskutonis, P. R., Baranauskiene, R., & Sarkinas, A., 2006.** Antimicrobial Activity of Commercial Samples of Thyme and Marjoram Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18 (6): 698-703.
476. **Skrovankova, S., Misurcova, L., & Machu, L., 2012.** Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*. 67: 76-139.
477. **Smahane, B., El Mansouri, L. Bouarfa, M., Ouhammou, A., Achour, S., Khadhr, M., & Boust, D., 2016.** Phytochemical Screening, Anti-Inflammatory and Analgesic Activities Of Formulation Cream of *Silene vulgaris*. *Res. J. Med. Plants*, 10: 150-158.
478. **Smallfield, B., 2003.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop. Food. Res.* p.p. 45-49.
479. **Soro, L. C., Grosmaire, L., Atchibri, A. O. A., Munier, S., Menut, C., & Pelissier, Y., 2015.** Variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* cultivées en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 88(1): 8180-8193.
480. **Southgate, B. J., 1979.** The importance of bruchidae as pests of grain legumes, their distribution and control. In *Pests of Grain Legumes, Ecology and Control* (Edited by Singh S. R., Emden H. F. van and Taylor A.), Academic press, London, p.p. 219-229
481. **Sriti Eljazi, J., Bachrouch, O., Salem, N., Msaada, K., Aouini, J., Hammami, Boushah, E., Abderraba, M., Limam, F., & Mediouni Ben Jemaa, J., 2018.** Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from coriander fruit against *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, and *Lasioderma serricornis*. *International Journal of Food Properties*, p.p. 1-13.
482. **Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Mihailovic, V., Topuzovic, M., & Solujic, S., 2012.** Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(2): 117-122.
483. **Stanojkovic, A., Cekovic, J., Comic, L., & Pivic, R., 2008.** Antibacterial properties of some plants from the family Asteraceae growing wild in Serbia. *Zbornik radova*. 26: 11-20.
484. **Stella, S., Predrag, L. & Arieh, B., 2010.** The Effect of an Aqueous Extract of *Teucrium polium* on Glutathione Homeostasis In Vitro: A Possible Mechanism of Its Hepatoprotectant Action. *Advances in Pharmacological Sciences*, 10:1-7.

485. **Sticher, O., & Flück, H., 1968.** Die Zusammensetzung von genuinen, extrahierten und destillierten ätherischen Ölen einiger Mentha-Arten. *Pharm. Acta Helv.*, 43: 411-446.
486. **Su, C. H., Wang, J. T., Hsiung, C. A., Chien, L. J., Chi, C. L., Yu, H. T., & Chang, S. C., 2012.** Increase of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in acute care hospitals in Taiwan: association with hospital antimicrobial usage. *PloS one*, 7(5): 77-88.
487. **Suslick, K.S., 1998.** Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4e éd. J. Wiley & Sons: New York, 26: 517-541.
488. **Sutour S., 2010.** *Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats*. Thèse de doctorat. Université de Corse, 222 p.
489. **Svobda, K. P., & Hampson, J. B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA5 6HW.
490. **Tago, D., Andersson, H., & Treich, N., 2014.** Pesticides and health: a review of evidence on health effects, valuation of risks, and benefit-cost analysis. In Preference Measurement in Health. *Emerald Group Publishing Limited*, p.p. 203-295.
491. **Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O., 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9): 1199-1218.
492. **Takayama, C., de-Faria, F. M., de Almeida, A. C. A., Dunder, R. J., Manzo, L. P., Socca, E. A. R., & Luiz-Ferreira, A., 2016.** Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 6(8): 677-681.
493. **Tamboli, D. P., & Lee, D. S., 2013.** Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of hazardous materials*, 260: 878-884.
494. **Tapondjou, L. A., Adler, C. L. A. C., Bouda, H., & Fontem, D. A., 2002.** Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of Stored Products Research*, 38(4): 395-402.
495. **Tassou, C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J., 2000.** Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33(3-4): 273-280.
496. **Taudou, A., 1990.** *Activité antifongique des labiatae. Données bibliographiques. Etudes in vitro de treize huiles essentielles (intérêt de la microémulsion)*. Doctorat d'état en sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 160 p.
497. **Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L., 2012.** European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil

- and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1): 81-87.
498. **Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B., 2003.** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4): 859-880.
499. **Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., & Luo, Y., 2009.** Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113(1): 173-179.
500. **Tian, L. L., & White, P. J., 1994.** Antioxidant activity of oat extract in soybean and cottonseed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(10): 1079-1086.
501. **Tietze L. F. & Modi A., 2000.** Multicomponent domino reactions for the synthesis of biologically active natural products and drugs. *Medicinal Research Reviews*, 20(4): 304-322.
502. **Tingey D. T., Manning M., Grothaus L. C. & Burns W. F., 1980.** Influence of light and temperature on monoterpene emission rates from slash Dine. *Phmt Physiol.*, 65: 797-801.
503. **Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J., 2009.** Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14): 5987-6000.
504. **Tripathi, A., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A., 2009.** Antibacterial applications of silver nanoparticles synthesized by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(1): 93-98.
505. **Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., & Bisignano, G., 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6): 2474-2478.
506. **Tsao, R., 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12): 1231-1246.
507. **Tsuchiya, H., & Iinuma, M., 2000.** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2): 161-165.
508. **Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., & Iinuma, M., 1996.** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*, 50(1): 27-34.
509. **Tunçw, I. & Sahinkaya, S., 1998.** Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86: 183-187.
510. **Turek, C., & Stintzing, F. C., 2013.** Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1): 40-53.
511. **Turgis, M., Han, J., Caillet, S., & Lacroix, M., 2009.** Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food control*, 20(12): 1073-1079.

512. **Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat, G., 2007.** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3): 484-496.
513. **Ultee, A., & Smid, E. J., 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3): 373-378.
514. **Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4): 1561-1568.
515. **Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10): 4606-4610.
516. **Usaid, A. A. P. I. D. I., 2008.** Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte Contre la Désertification: Maroc, 70 p.
517. **Utida, S., 1981.** Polymorphism and phase dimorphism in *Callosobruchus*. In *The Ecology of Bruchids Attacking Legumes (Pulses)*. Springer, Dordrecht. p.p. 143-147.
518. **Vamanu, E., & Nita, S., 2013.** Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom. *BioMed Research International*, 11 p.
519. **Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., & Tepe, B., 2003.** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51(1): 63-67.
520. **Velasco-Negueruela, A., & Perez-Alonso, M. J., 1990.** The volatiles of six *Teucrium* species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Phytochemistry*, 29(4): 1165-1169.
521. **Vijayarathna, S., Zakaria, Z., Chen, Y., Latha, L. Y., Kanwar, J. R., & Sasidharan, S., 2012.** The antimicrobial efficacy of *Elaeis guineensis*: characterization, in vitro and in vivo studies. *Molecules*, 17(5): 4860-4877.
522. **Villar, A., Gasco, M.A., Alcaraz, M.J., 1987.** Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8- glucoside in acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39 (7): 502-507.
523. **Viuda-Matros, M., Ruiz, N.Y., Fernandez, L.J., & Perez, J.A., 2011.** Spices as functional foods: a review. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1): 13-28.
524. **Wang, D., Collinsc, P. J. & Gao, X., 2006.** Optimising indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects. *Journal of Stored Products Research*, 42(2): 207-217.
525. **Wang, L., & Weller, C.L., 2006.** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Techno.*, 17: 300-312.

526. Wang, M.F., Tadmor, Y., Wu, Q.L., Chin, C.K., Garrison, S.A., & Simon, J.E., 2003. Quantification of Protodioscin and Rutin in Asparagus Shoots by LC/MS and HPLC Methods. *J Agric Food Chem.*, 51: 6132–6136.
527. Wang, Y., Chen, S., & Yu, O., 2011. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4): 949.
528. War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav*, 7(10): 1306-1320.
529. Wightman, J. A., & Southgate, B. J., 1982. Egg morphology, host, and probable regions of origin of the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) that infest stored pulses. *New Zealand journal of experimental agriculture*, 10(1): 95-99.
530. Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3–19.
531. Winkel, B. S. J., 2007. The Biosynthesis of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold, Ed. Springer, p.p. 71-95.
532. Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X., 2013. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric. Food Chem.*, 6: 8185-8190.
533. Xu, B. J., & Chang, S. K. C., 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72(2): 159-166.
534. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12): 1249-1255.
535. Yahiaoui, F., Benameur, Q., Ben-Mahdi, M. H., 2017. Antibacterial activity of Mentha pulegium essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics *Int J Pharm Pharm Sci.*, 9(6): 35-41.
536. Yala, J. F., Ntsameso-Mve-Mba, V., Issembe, Y. A., Lepengue, N. A., & Souza, A., 2016. Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'Eryngium foetidum récolté dans la ville de Franceville. *Journal of Applied Biosciences*, 103(1): 9886-9893.
537. Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary Polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 21: 381–406.
538. Yen, T. B., & Chang, ST., 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Biore. of Techno.*, 99: 232-236.
539. Yeom, H. J., Lee, H. R., Lee, S. C., Lee, J. E., Seo, S. M., & Park, I. K., 2018. Insecticidal Activity of Lamiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents Against Blattella germanica L. Adult. *Journal of economic entomology*, 111(2): 653-661.
540. Yildirim, F., Memis, Y., Ozturk, A., Caliskan, Z., Savran, A., & Abdullah, M. I., 2017. Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the Extracts of Kitaibelia balansae Species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3): 809-819.

541. **Youdim, K. A., McDonald, J., Kalt, W., & Joseph, J. A., 2002.** Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(5): 282-288.
542. **Zaika L. L., 1988.** Spices and Herbs - Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety*, 9(2): 97-118.
543. **Zantar, S., Haouzi, R., Chabbi, M., Laglaoui, A., Mouhib, M., Boujnah, M., & Zerrouk, M. H., 2015.** Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *Radiation Physics and Chemistry*, 115: 6-11.
544. **Zargari, A., 1990.** Herbal Medicines. Publication of Tehran University, Iran, p.p. 14-18.
545. **Zazouli, S., Chigr, M., & Jouaiti, A., 2016.** Effect of polar and nonpolar solvent on total phenolic and antioxidant activity of roots extracts of *Caralluma europaea*. *Der Pharma Chemica*, 8(11): 191-196.
546. **Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., El Belghiti, M. A., & Zair, T., 2013.** Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 2(4): 607-619.
547. **Zermane, A., Larkeche, O., Meniai, A. H., Crampon, C., & Badens, E., 2016.** Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO₂ using response surface methodology. *Comptes Rendus Chimie*, 19(4): 538-543.
548. **Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., & Krajmalnik-Brown, R., 2009.** Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7): 2365-2370.
549. **Zhao, N. N., Zhang, H., Zhang, X. C., Luan, X. B., Zhou, C., Liu, Q. Z., & Liu, Z. L., 2013.** Evaluation of acute toxicity of essential oil of garlic (*Allium sativum*) and its selected major constituent compounds against overwintering *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(3): 1349-1354.
550. **Zhiri, A., & Baudoux, D., 2005.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg, 8 p.
551. **Zwaving, JH, & Smith, D., 1971.** Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Phytochem.*, 10: 1951-1953.

Annexes

Tableau 1 : Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle quadratique de surface de réponse du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

| Source | Coefficients d'estimation | Somme des carrés | Valeur de F | Valeur de p* |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------|-------------|--------------|
| Modèle | 2.23 | 1.35 | 71.12 | < 0.0001 |
| X₁ | 0.35 | 0.98 | 464.14 | < 0.0001 |
| X₂ | 0.095 | 0.072 | 34.19 | 0.0006 |
| X₃ | 0.047 | 0.018 | 8.55 | 0.0222 |
| X₁X₂ | -0.028 | 3.025×10 ⁻³ | 1.43 | 0.2703 |
| X₁X₃ | -7.500 ×10 ⁻³ | 2.250×10 ⁻⁴ | 0.11 | 0.7536 |
| X₂X₃ | 0.017 | 1.225×10 ⁻³ | 0.58 | 0.4711 |
| X₁² | -0.26 | 0.27 | 129.92 | < 0.0001 |
| X₂² | -0.010 | 4.424×10 ⁻⁴ | 0.21 | 0.6610 |
| X₃² | 0.015 | 9.161×10 ⁻⁴ | 0.43 | 0.5312 |
| Résiduel | | 0.015 | | |
| Manque d'ajustement | | 6.100×10 ⁻³ | 0.94 | 0.5013 |
| Erreure pure | | 8.680×10 ⁻³ | | |
| Total | | 4271.54 | | |
| R² | | 0.9892 | | |
| R² ajusté | | 0.9753 | | |
| R² prédit | | 0.9186 | | |
| C.V. % | | 2.18 | | |
| PRESS | | 0.11 | | |

(X₁ ; temps d'extraction, X₂ ; puissance ultrasonique et X₃ ; rapport matière végétale/eau) ; *p<0.01 hautement significatif ; 0.01≤p<0.05 significatif ; p≥0.05 non significatif.

Tableau 2 : L'analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique de surface de réponse du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Teucrium polium*.

| Source | Coefficients d'estimation | Somme des carrées | Valeur de F | Valeur de p* |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------|-------------|--------------|
| Modèle | 0.48 | 0.29 | 28.20 | 0.0001 |
| X₁ | 0.16 | 0.21 | 185.31 | < 0.0001 |
| X₂ | 0.070 | 0.039 | 34.39 | 0.0006 |
| X₃ | 0.040 | 0.013 | 11.23 | 0.0122 |
| X₁ X₂ | -2.500×10 ⁻³ | 2.500×10 ⁻⁵ | 0.022 | 0.8864 |
| X₁ X₃ | -0.012 | 6.250×10 ⁻⁴ | 0.55 | 0.4831 |
| X₂ X₃ | 0.043 | 7.225×10 ⁻³ | 6.34 | 0.0400 |
| X₁² | -0.063 | 0.017 | 14.54 | 0.0066 |
| X₂² | 7.250×10 ⁻³ | 2.213×10 ⁻⁴ | 0.19 | 0.6728 |
| X₃² | 0.022 | 2.084×10 ⁻³ | 1.83 | 0.2184 |
| Résiduel | | 7.980×10 ⁻³ | | |
| Manque d'ajustement | | 2.500×10 ⁻³ | | 0.6440 |
| Erreur pure | | 5.480×10 ⁻³ | | |
| Total | | 0.30 | | |
| R² | | 0.9732 | | |
| R² ajusté | | 0.9386 | | |
| R² prédit | | 0.8367 | | |
| C.V. % | | 7.30 | | |
| PRESS | | 0.049 | | |

(X₁ ; temps d'extraction, X₂ ; puissance ultrasonique et X₃ ; rapport matière végétale/eau) ; *p<0.01 hautement significatif ; 0.01≤p<0.05 significatif ; p≥0.05 non significatif.

Tableau 3 : Etudes antérieures des principaux constituants des huiles essentielles de *Mentha pulegium* dans plusieurs pays et régions d'Algérie.

| Origine | Partie de la plante | Méthode d'extraction | Composés majoritaires (%) | Référence |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|--|
| Corse (Morosaglia) | Parties aériennes | Entraînement à la vapeur | Pulégone 50.5 Isomenthone 20.7 Menthone 12.3 | Sutour , (2010). |
| Algérie (Sétif) | Parties aériennes | Hydrodistillation | Pulégone 38.8 Menthone 19.3 Pipériténone 16.5 Pipéritone 6.3 Isomenthone 6.1 | Boukhebt i et <i>al.</i> , (2011). |
| Maroc | Parties aériennes | Entraînement à la vapeur | Pulégone 69.7 Pipériténone 3.1 | Ait-Ouazzou et <i>al.</i> , (2012). |
| Italie | Feuilles | Hydrodistillation | Pulegone 34.2 Menthone 18.8 Isomenthone 11.3 | Caboni et <i>al.</i> , (2013). |
| Portugal | Parties aériennes | Hydrodistillation | Pulégone 52.0-82.0 Isomenthone 2.0-36.0 Menthone 0.1-17.0 | Rodrigues et <i>al.</i> , (2013). |
| Tunisie | Feuilles | Hydrodistillation | Menthone 41.7 cis-isopulégone 31.7 Isomenthone 15.0 | Ghazghazi et <i>al.</i> , (2013). |
| Brésil | Feuilles | Hydrodistillation | Pulégone 26.65-31.05 Pipéritenone 12.60-36.32 | Foganholi et <i>al.</i> , (2015). |
| Algérie (Bouira) | Feuilles | Entraînement à la vapeur | Pulégone 70.66% Néo-Menthol 11.21% Menthone 2.63% | Abdelli et <i>al.</i> , (2016). |

| | | | Cis-isopulégone | |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|---|-------------------------------------|
| | | | 2.33 | |
| Algérie (Bejaia) | Parties aériennes | Hydrodistillation | Pulégone 88.78 Néo-menthol 2.083 | Yahiaoui et al. , (2017). |
| Turquie | Parties aériennes | Hydrodistillation | Oxyde de piperiténone 72.77 Carvacrol 4.03 Germacrène-D 3.79 | Sevindik et al. , (2017). |

Tableau 4 : Etudes antérieures des principaux constituants des huiles essentielles de *Teucrium polium* dans le monde et plusieurs régions d'Algérie.

| Origine | Partie de la plante | Méthodes d'extraction | Composés majoritaires (%) | Référence |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|---|---|
| Algérie (Ain Mlila) | Parties aériennes | Hydrodistillation | α -Cadinol 46.8 3 β -hydroxy- α -muurolène 22.5 α -pinène 9.5 β -pinène 8.3 | Kabouche et al. , (2007). |
| Algérie (Tamanrasset) | Parties aériennes | Hydrodistillation | Limonène 11.2 β -Caryophyllène 9.2 γ -Cadinène 10.2 | Hammoudi et al. , (2013). |
| Algérie (Tlemcen) | Parties aériennes | Entraînement à la vapeur | Germacrène D 25.81 Bicyclogermacrène 13 β -pinène 11.7 Carvacrol 8.9 Spathuléol 6.53 | Belmekki et al. (2013). |
| Algérie (Sétif) | Parties aériennes | Hydrodistillation | α -pinène 14.1-18 β -pinène 15-18.1 Germacrène D 3.8-19 Myrcène 8.2-10.4 Limonène 5.3 -8.7 | Lograda et al. , (2014). |
| Tunisie | Parties aériennes | Hydrodistillation | α -pinene 17.04 β -pinene 12.68 Limonene 6.65 β -myrcene 6.07 Germacrene D 5.89 | Bakari et al. , (2015). |
| Iran | Fruits | Hydrodistillation | α -pinène 18.2 Elémol 14.5 β -pinène 10.1 Cubéol 10.0 Limonène 5.0 | Sabzeghabaie et Asgarpanah (2016). |
| Turquie | Parties | Hydrodistillation | Germacrène D 8.10 | Kurtoğlu et Tın |

| | | | | |
|-------------|----------------------|-------------------|--|---|
| | aériennes | | Carvacrol 5.41 β -pinène 4.63 α -copaène 3.40 Spathuléol 3.32 | (2017). |
| Iran | Parties aériennes | Hydrodistillation | β -caryophyllène 12.80- 28.40 Farnésène-cis-b 5.60- 18.40 Germacrène D 2.10 -13.40 Bicyclogermacrène 3.40- 12.00 Linalool 1.80-15.65 Carvacrol 1.70- 8.60 | Asgharipour et Shabankare (2017). |

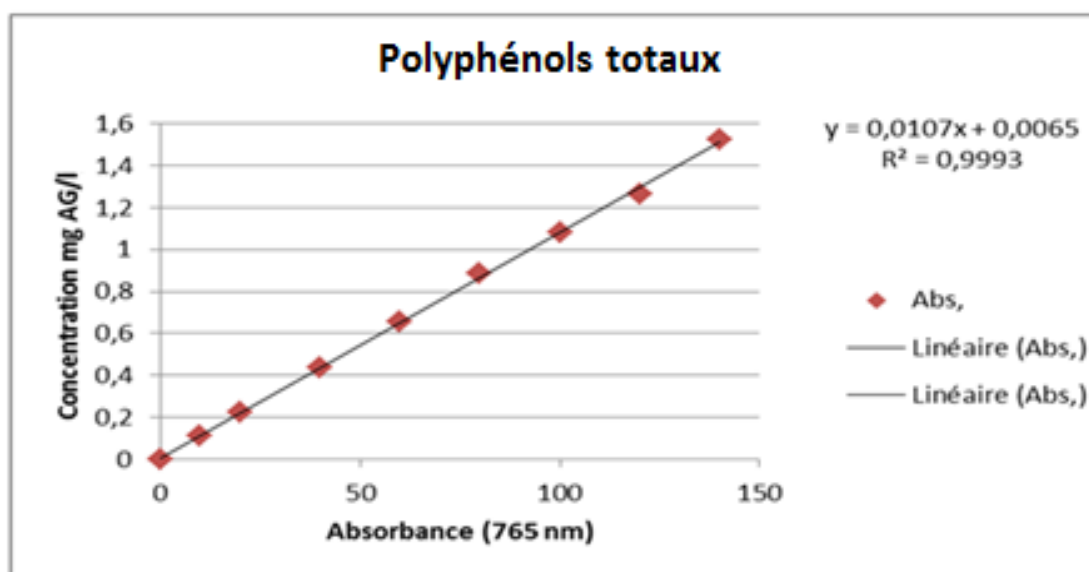


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

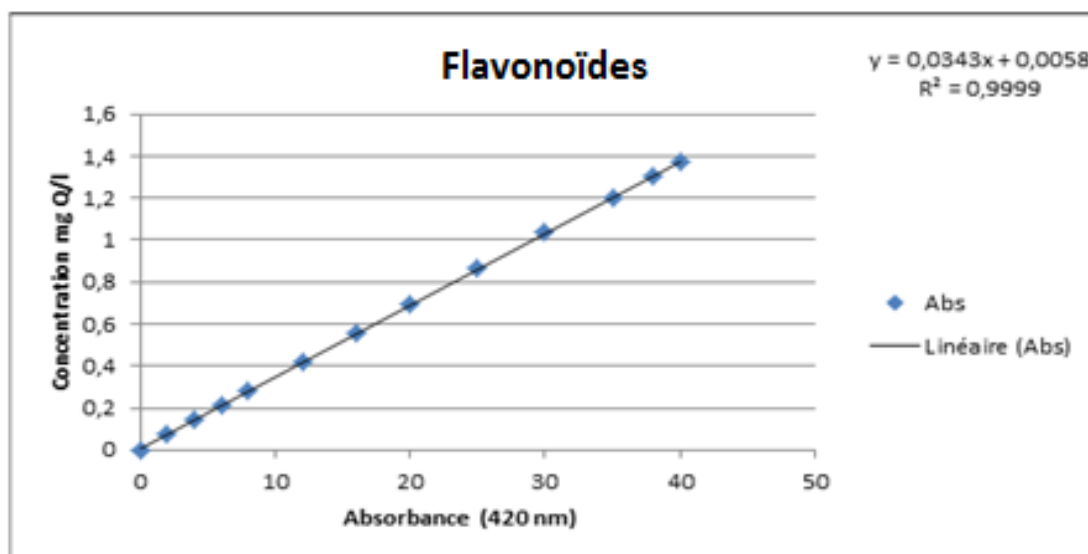


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

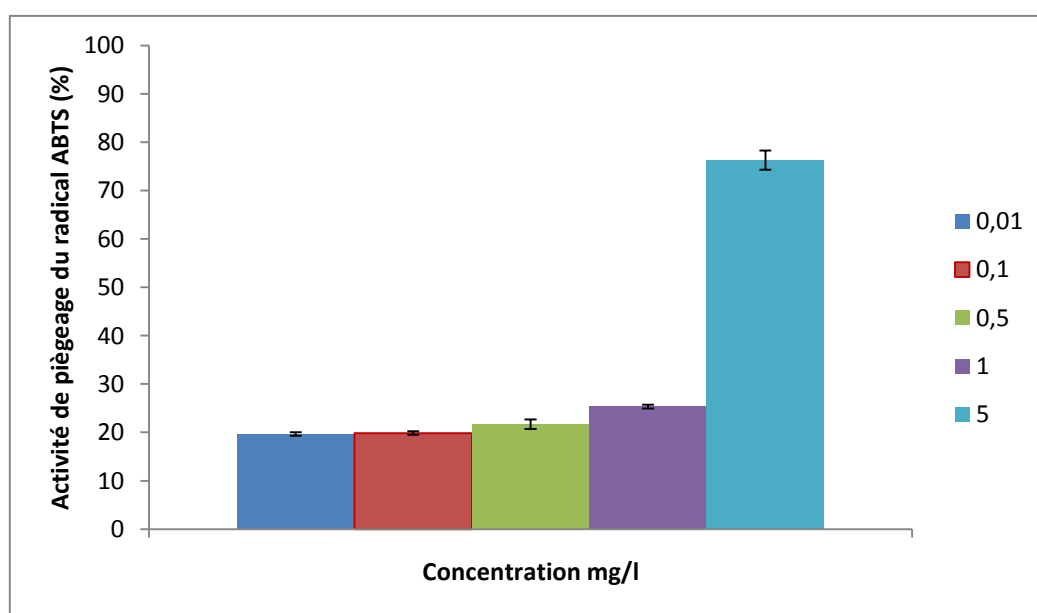


Figure 3 : Activité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par le Trolox.

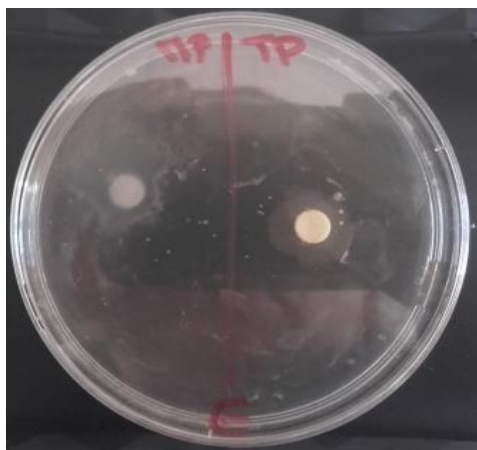


Figure 4: Zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Escherichia Coli*.

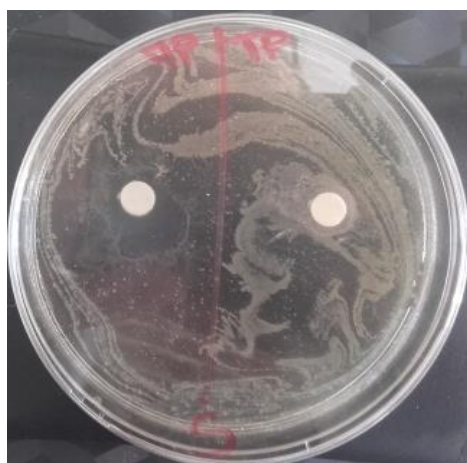


Figure 5: Zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Staphylococcus aureus*.

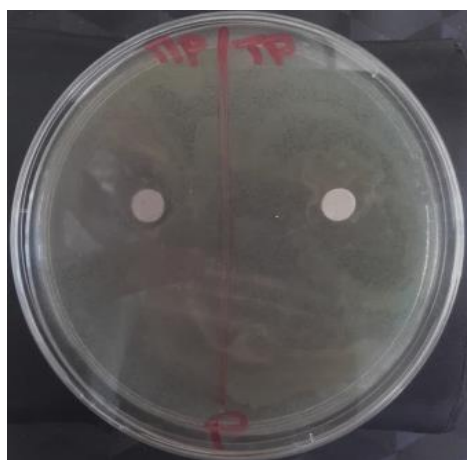


Figure 6: Zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*.

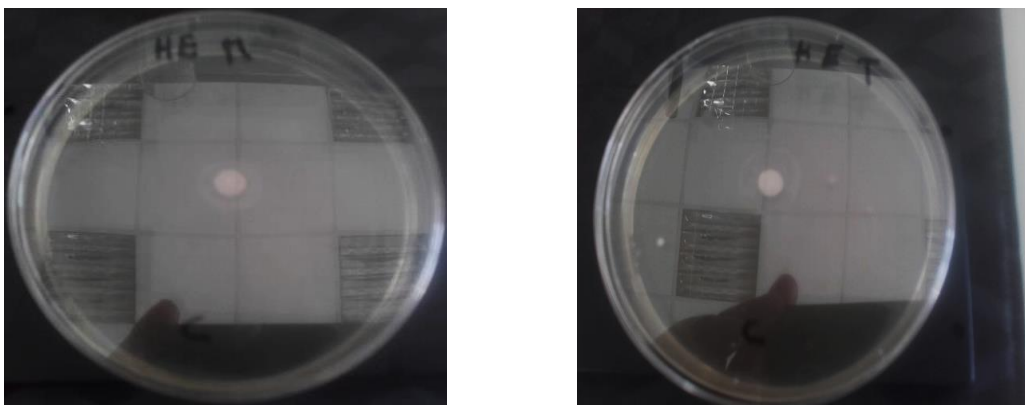


Figure 7: Zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Candida albicans*.

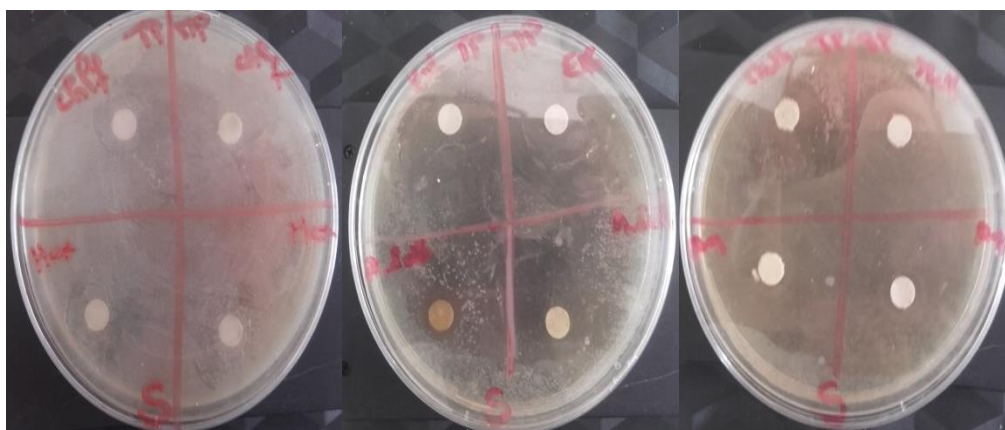


Figure 8: Zones d'inhibition des extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Staphylococcus aureus*.

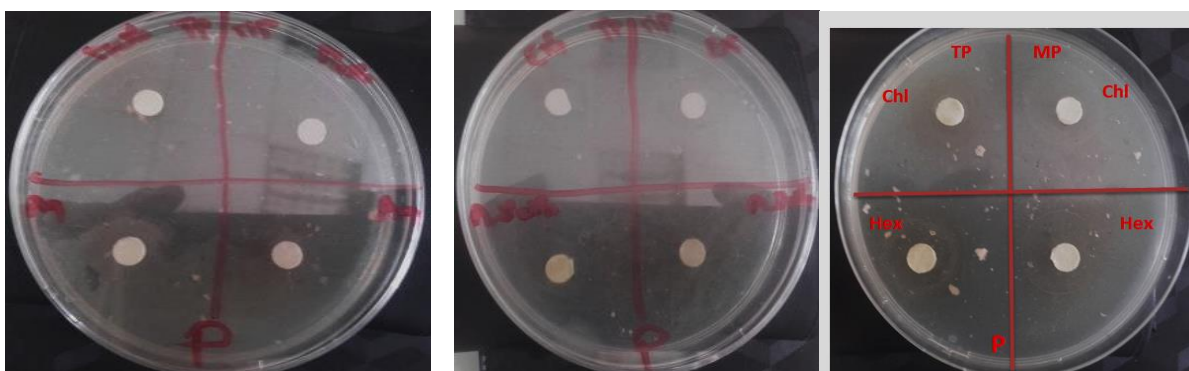


Figure 9: Zones d'inhibition des extraits de *Mentha pulegium* et de *Teucrium polium* sur *Pseudomonas aeruginosa*.

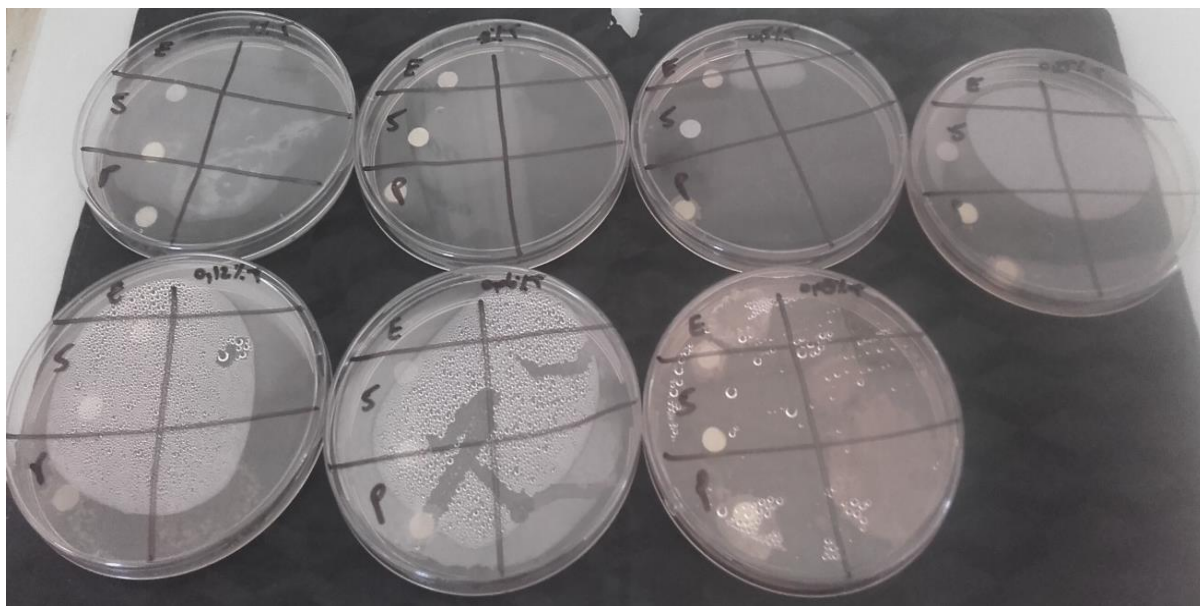


Figure 10: Illustration de la CMI de l'huile essentielle de *Teucrium polium* vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées.



Figure 11 : Illustration de la CMI de l'huile essentielle de *Teucrium polium* vis-à-vis de *Candida albicans*.

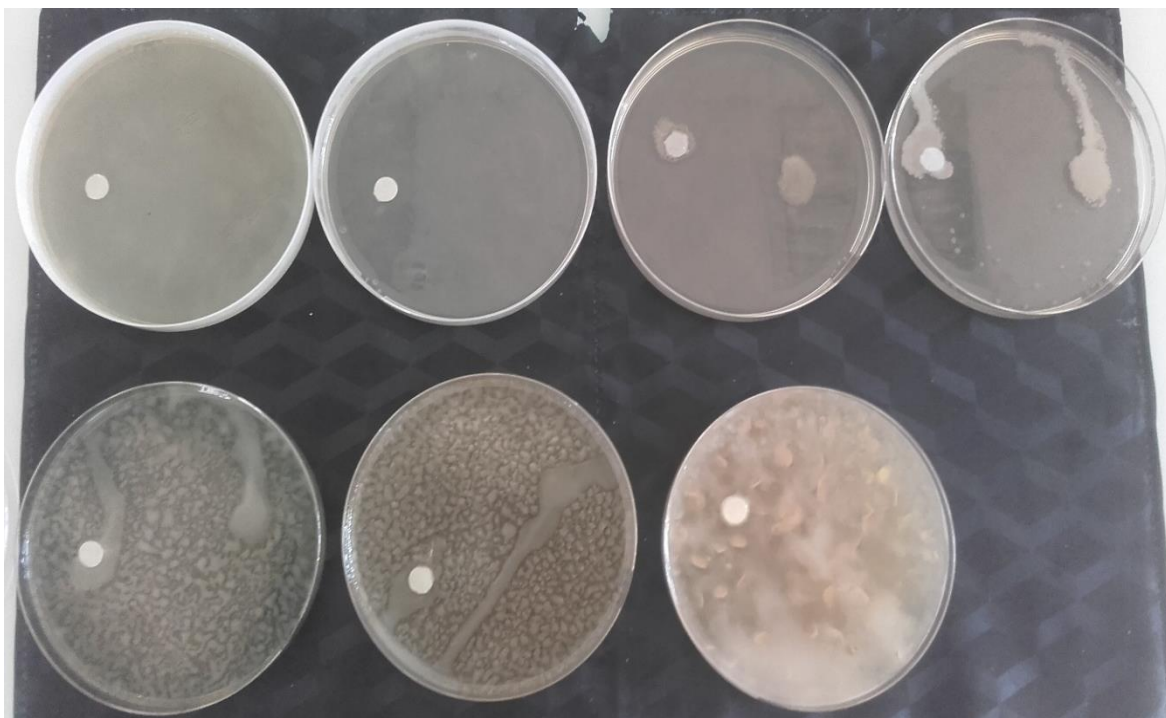


Figure 12 : Illustration de la CMI de l'extrait acétate d'éthyle de *Mentha pulegium* vis-à-vis de *Candida albicans*.

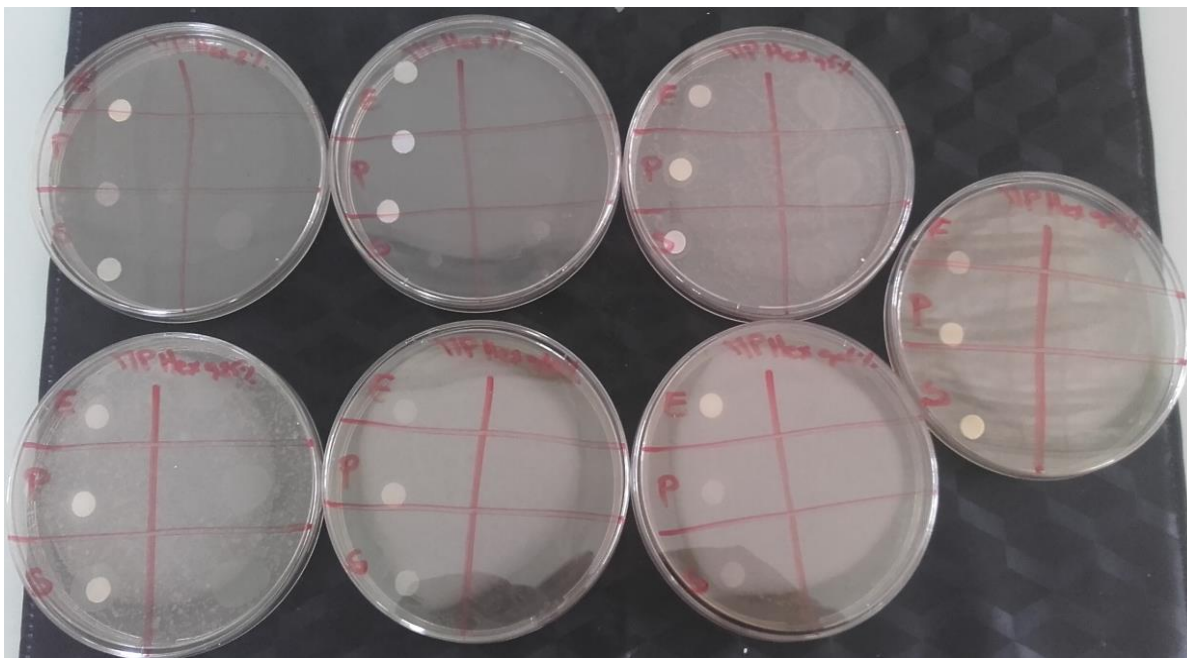


Figure 13: Illustration de la CMI de l'extrait hexane de *Mentha pulegium* vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées.

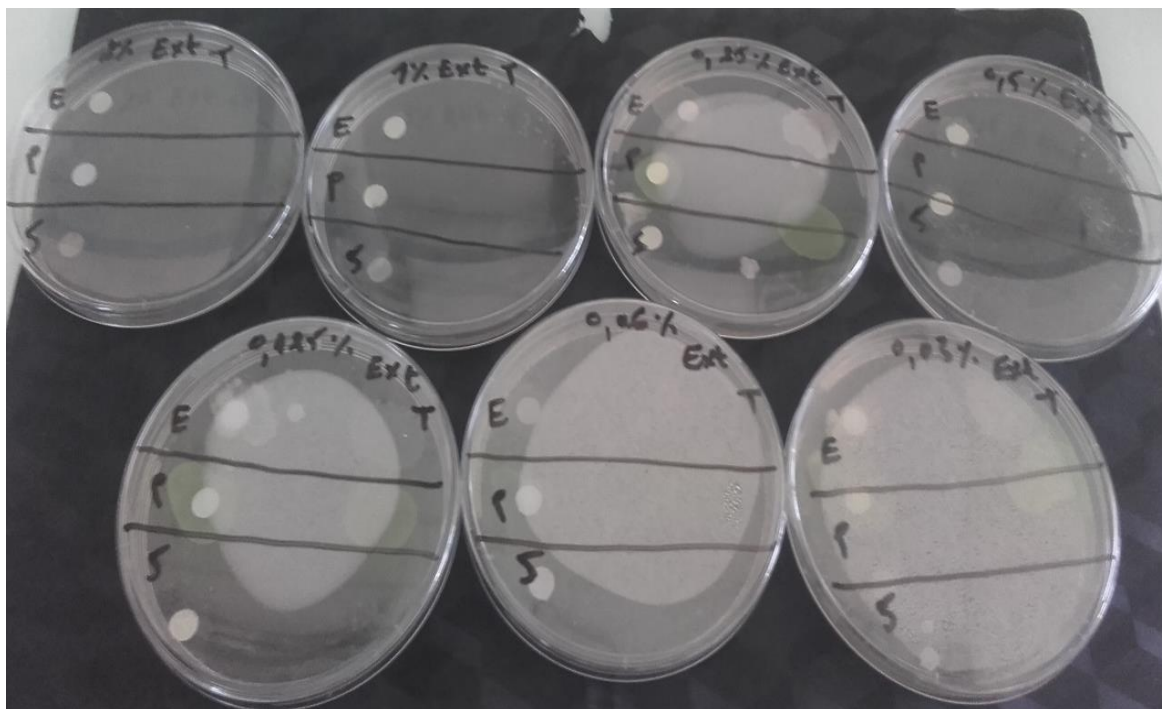


Figure 14: Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* vis-à-vis des 3 souches bactérienne testées.

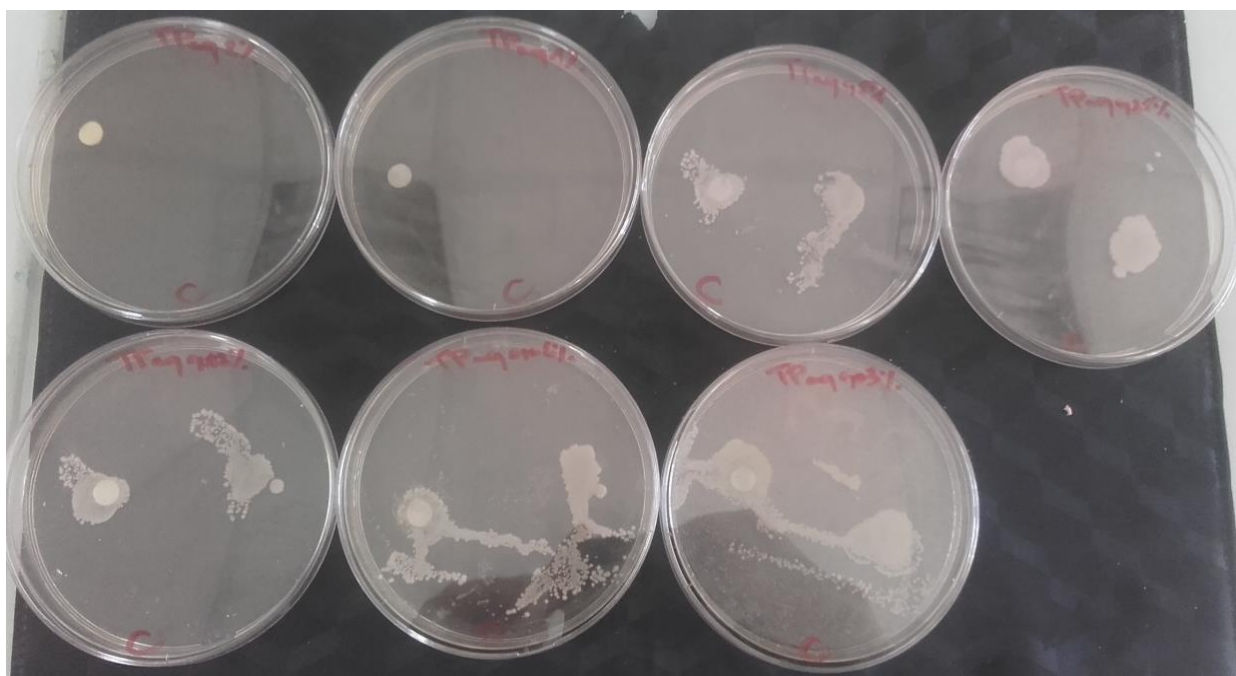


Figure 15: Illustration de la CMI de l'extrait aqueux de *Teucrium polium* vis-à-vis de *Candida albicans*.

Tableau 5 : Analyse statistique des activités biologiques étudiées par le test de Shapiro-Wilks.

| | Variable | Facteur | p-values | Décision |
|-------------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Activité antioxydante | DPPH | HE | 0.90111 | Normalité |
| | | Extraits MP | 0.91676 | Normalité |
| | | Extraits TP | 0.88691 | Normalité |
| | ABTS | HE | 0.90856 | Normalité |
| | | Extraits MP | 0.85872 | Normalité |
| | | Extraits TP | 0.86356 | Normalité |
| | Pouvoir réducteur | HE | 0.63978 | Normalité |
| | | Extraits MP | 0.90528 | Normalité |
| | | Extraits TP | 0.87814 | Normalité |
| Activité antimicrobienne | Aromatogramme | HE | 0.69074 | Normalité |
| | | Extraits MP | 0.59444 | Normalité |
| | | Extraits TP | 0.79823 | Normalité |
| Activité insecticide | Contact | HE | 0.92544 | Normalité |
| | | Extraits MP | 0.79644 | Normalité |
| | | Extraits TP | 0.92544 | Normalité |
| | Inhalation | HE | 0.75532 | Normalité |

(HE ; Huiles essentielles, MP ; *Mentha pulegium*, TP ; *Teucrium polium*) ; p-value <0.05 les variables n'obéissent pas à une loi normale ; p-value >0.05 les variables obéissent à une loi normale.

Valorisation des travaux de la thèse

Les travaux relatés dans ce manuscrit ont fait l'objet de deux publications scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture.

1. **Ait Chaouche, F. S.**, Mouhouche, F., Hazzit, M., & Ferradji, A., 2017. Optimization of extraction yield of Algerian *Mentha pulegium* L. essential oil by ultrasound-assisted hydrodistillation using response surface methodology. *Research Journal of Phytochemistry*, 11: 142-149.
2. **Ait Chaouche, F., S.**, Mouhouche, F., & Hazzit, M., 2018. Antioxidant capacity and total phenol and flavonoid contents of *Teucrium polium* L. grown in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 11(2): 135-144.

Résumé : Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae.

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous avons mené une étude sur deux Lamiaceae très utilisées par la population locale pour leurs propriétés thérapeutiques, à savoir la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) et la germandrée tomenteuse (*Teucrium polium* L.). L'objectif de ce travail de recherche était d'étudier la composition chimique et l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de ces deux Lamiaceae. La méthodologie des surfaces de réponse a été utilisée pour optimiser les paramètres influençant l'extraction des huiles essentielles des deux plantes par le procédé d'hydrodistillation assistée par ultrasons. L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée par CPG et CG/SM. L'effet des différents solvants d'extraction sur la teneur en polyphénols a été étudié. Le pouvoir antioxydant a été évalué par les tests de DPPH, de l'ABTS^{•+} et du pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne a été déterminée qualitativement et quantitativement sur trois souches bactériennes et une levure. Le potentiel insecticide des huiles essentielles et des extraits a été évaluée à l'égard des adultes de *Callosobruchus maculatus*. Selon les résultats de la méthodologie des surfaces de réponse, les conditions optimales permettant d'obtenir le rendement maximal en huiles essentielles étaient une durée d'extraction de 60 min, une puissance ultrasonique de 60 W et un rapport matière végétal/eau de 1:12 g/ml. L'analyse des huiles essentielles par GC/MS a révélé que l'isomenthone (37.1%), la pulégone (34.8%) et la menthone (10.4%) étaient les composés majoritaires de l'essence de *Mentha pulegium*, tandis que, le t-Cadinol (17.9%), la germacrène D (16.1%) et la β -pinène (9.7%) dominaient l'huile essentielle de *Teucrium polium*. Le méthanol s'est avéré être le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols à partir des plantes étudiées. Les différents extraits examinés ont révélé une plus forte activité antioxydante que celles des huiles essentielles. Les huiles essentielles et les extraits des plantes étudiées ont exprimé une activité antimicrobienne intéressante contre toutes les souches testées. L'huile essentielle de *Mentha pulegium* a exercé le meilleur effet insecticide contre les adultes, les œufs et les larves de *Callosobruchus maculatus*. Les résultats obtenus ont révélé que les huiles essentielles et les extraits des deux Lamiaceae étudiées possèdent un énorme potentiel comme alternatives aux conservateurs et aux pesticides chimiques de synthèse.

Mots clés : Huiles essentielles, Méthodologie des surfaces de réponse, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Activité insecticide.

Astract: Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity of essential oils and extracts of two Lamiaceae.

In the framework of the valorization of the Algerian flora, we conducted a study on two Lamiaceae widely used by the local population for their therapeutic properties, namely pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) and felty germander (*Teucrium polium* L.). The objective of this research was to study the chemical composition and the antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity of the essential oils and extracts of these two Lamiaceae. The response surface methodology was used to optimize the parameters influencing the extraction of essential oils from both plants by the ultrasonic assisted hydrodistillation method. The analysis of the chemical composition of the essential oils is carried out by GPC and GC / MS. The effect of different extraction solvents on the polyphenol content was studied. The antioxidant power was evaluated by DPPH, ABTS^{•+} and reducing power tests. The antimicrobial activity was determined qualitatively and quantitatively on three bacterial strains and one yeast. The insecticidal potential of essential oils and extracts was assessed against adults of *Callosobruchus maculatus*. According to the results of the response surface methodology, the optimal conditions for obtaining the maximum yield of essential oils were an extraction time of 60 min, an ultrasonic power of 60 W and a plant / water ratio of 1: 12 g/ml. The analysis of essential oils by GC/MS revealed that isomenthone (37.1%), pulegone (34.8%) and menthone (10.4%) were the major constituents of *Mentha pulegium* essential oil, while t-Cadinol (17.9%), germacrene D (16.1%) and β -pinene (9.7%) dominated *Teucrium polium* essential oil. Methanol proved to be the most effective solvent for extracting polyphenols from the plants studied. The various extracts examined revealed a stronger antioxidant activity than those of essential oils. The essential oils and extracts of the plants studied showed interesting antimicrobial activity against all microbial strains tested. *Mentha pulegium* essential oil had the best insecticidal effect against adults, eggs and larvae of *Callosobruchus maculatus*. The results show that the essential oils and extracts of the two Lamiaceae studied have a huge potential as an alternatives to chemical synthetic preservatives and pesticides.

Keywords: Essential oils, Response surface methodology, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Insecticidal activity.

ملخص: التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأكسدة، للميكروبات والحشرات للزيوت العطرية ومستخلصات نبتتين من العائلة الشفوية

من أجل تثمين النباتات الجزائرية، أجرينا دراسة على نبتتين من العائلة الشفوية المستخدمة على نطاق واسع من قبل السكان المحليين لخصائص علاجية، وهما:

النعناع الأوروبي *Mentha pulegium* L.

الجعدة *Teucrium polium* L.

كان الهدف من هذا البحث هو دراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأكسدة، للميكروبات والحشرات للزيوت العطرية ومستخلصات نبتتين من الشفويات. تم استخدام منهجية مساحات الإجابة لتحسين المعلمات التي تؤثر على استخراج الزيوت الأساسية من كلا النبتتين بواسطة عملية التقطير بالماء وبمساعدة الموجات فوق الصوتية. تم تنفيذ التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة CPG و SM / CG. تمت دراسة تأثير مذيبات الاستخلاص المختلفة على محتوى البولي فينول. تم تقييم قدرة مضادات الأكسدة بواسطة DPPH و $ABTS^{+•}$ و خفض اختبارات الطاقة. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات نوعياً وكمياً على ثلاث سلالات بكتيرية وخميرة واحدة. تم تقييم إمكانية النشاط المضاد للحشرات للزيوت الأساسية وللمستخلصات ضد البالغين من

Callosobruchus maculatus.

وفقاً لنتائج منهجية مساحات الإجابة، كانت الظروف المثلى للحصول على أقصى إنتاج من الزيوت العطرية: وقت استخلاص 60 دقيقة، وقوة بالموجات فوق الصوتية من 60 واط ونسبة النبات / الماء من 1 : 12 غ / مل. كشف تحليل الزيوت العطرية بواسطة GC / MS أن (37.1%) isomenthone، (34.8%) pulegone، (10.4%) menthone، (16.1%) germacrene D و β pinene في حين سيطر (17.9%) T-Cadinol، في حين سيطر (9.7%) على الزيت العطري لـ *Teucrium polium*. أثبت الميثانول أنه المذيب الأكثر فعالية لاستخراج مادة البوليفينول من النباتات التي تمت دراستها. المستخلصات المختلفة التي تم فحصها كشفت عن نشاط مضاد للأكسدة أقوى من نشاط الزيوت العطرية. أظهرت الزيوت العطرية ومستخلصات النباتات التي أجريت عليها الدراسة نشاطاً مثبّراً للميكروبات ضد جميع السلالات التي تم اختبارها. كان للزيت العطري للنعناع الأوروبي أفضل تأثير ضد الحشرات البالغين، البيض واليرقات من *Callosobruchus maculatus*. أوضحت النتائج أن الزيوت الأساسية ومستخلصات النبتتين من الشفويات لهما إمكانات هائلة كبدايل للمواد الحافظة والمبيدات الكيميائية الاصطناعية.

العلامات المتناحية: الزيوت العطرية، منهجية مساحات الإجابة، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد

للحشرات.