

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SUPERIEUR

Université Constantine 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie écologie végétale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie Végétal
Spécialité : Métabolisme secondaire

*Etude des huiles essentielles de la plante mentha
piperita et tester leurs effets sur un modèle biologique
des infusoires*

Présentée et soutenu par : - **ABADLIA Maroua**

le : **22/06/2014**

-**CHEBBOUR Aicha Hana**

Jury d'évaluation :

Président du jury : **CHIBANI SALIH**

Rapporteur : **BOUCHIHA HANENE**

Examineur : **BOUCHIBI NACERA**

Année universitaire

2013/2014

Remerciement

*Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage
et les moyens a fin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*Je remercié le juré : M^{rs} Chibani Salih ainsi M^{me} Bouchibi Nacera pour avoir
l'honneur de présider ce jury.*

*Ce mémoire a été dirigé par Bouchiha Hanén. L'importance qu'elle accorda dès
le début de ce travail, à l'étude de cas et à son interprétation, contribua pour
beaucoup à la progression de ce mémoire. De ce fait, je tiens à lui adresser mes
sincères remerciements et je voudrais également lui exprimer ma reconnaissance
pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien.*

*Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude, reconnaissance et remerciement
à tous mes enseignants: M^{me} Bouchoukh Imen, Baaziz Wided pour leur soutient et leur
aide.*

*Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux personnes qui ont
participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail, surtout*

Merci à tous et à toutes.

CHEBBOUR AICHA HANA

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Je tiens à remercier sincèrement madame Hanen BOUCHIHA , qui, en tant que Directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également à madame Wided BAZIZ, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches ma grande mère Mimi allah yarhamha mes frères Mehdi Tarek et Minou ma sœur Sabrina mes nièce Milina Jomana et Razan et mes amies Sara Asma Yasmine , qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à

ABADLIA MAROUA

Dédicace

A la mémoire de mes grands parents. A mes très chers parents mes frères
ma sœur mon fiancé Hamza mes amies je dédie ce mémoire .

ABADLIA Maroua

Dédicace

A mes très chers parents mes frères mes amies mon cousin Karim je
dédie ce mémoire.

CHEBBOUR Aicha Hana

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

HE : huiles essentielles.

u.m.a : unité de masse atomique.

COV : composé organique volatile.

CONV : composé organique non volatile.

Cm : centimètres.

G : grammes.

Mg : milligramme.

Ml : millilitre.

Mn : minutes.

J : jours.

SM : souche mère.

R : répétition.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CCM : chromatographie sur couche mince.

IC50: Concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50%.

Vtc : Vitamine c.

DPPH : (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl).

IR : indice de réfraction

Liste des tableaux

Tableau 01 : Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle dans le monde (Who, 2002).....	5
Tableau 02 : classification et reproduction des champignons.....	21
Tableau 03 : classification de la menthe poivrée.....	32
Tableau 04 : l'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile essentielle étudiée selon les normes.....	44
Tableau 05: résultat du rendement.....	44
Tableau 06 : résultat d'IR.....	45
Tableau 07 : résultat de la densité.....	46
Tableau 08 : différence entre menthol et menthone.....	47
Tableau 09: résultats des criblages des tanins et des flavonoïdes.....	48
Tableau 10: Caractères macroscopiques des souches.....	49
Tableau 11 : Caractères microscopiques des souches.....	50
Tableau 12 : Diamètres (cm) des zones d'inhibition des huiles essentielle de <i>Mentha piperita</i>	52
Tableau 13 : résultats de l'activité antioxydante.....	53
Tableau 14 : résultats de l'activité antioxydante.....	55
Tableau 15: le pourcentage d'inhibition antioxydante de vitamine C.....	56
Tableau 16 : résultat de l'IC50 de H.E de <i>mentha piperita</i>	57
Tableau 17: dosage des protéines.....	57
Tableau 18 : dosage des lipides.....	59

Liste des figures

Figure 1 : quelques plantes aromatiques	4
Figure 2 : des médicaments à base d'He.....	8
Figure 3 : utilisation d'He dans la cosmétique.....	9
Figure 4. Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles.....	10
FIGURE 5 : Schémas des principales formes de squelettes carbonés des mono et sesquiterpènes (modifié d'après Dudareva, Néré et al. 2006).....	13
FIGURE 6 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle.....	14
Figure 7 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	15
Figure 8 : L'extraction par solvants volatils.....	16
Figure 9 : structure des moisissures.....	20
Figure 10 : Classification des champignons (Kwon Chung et Bennett, 1992).....	22
Figures 11 : feuilles et fleurs de la menthe poivrée.....	32
Figure 12 : montage d'hydrodistillation (clèvenger).....	34
Figure 13 : le refractomètre.....	35
Figure 14 : Ph mètre.....	36
Figure 15 : appareillages CPG.....	37
Figure 16 : extrait méthanolique de la menthe poivrée.....	38
Figure 17 : principaux matériels du dosage.....	41
Figure 18 : huiles essentielles extraite.....	44
Figure 19 : graphe représente la CPG de L'He de la menthe poivrée.....	46
Figure 20 : CCM.....	46
Figure 21 : molécules de menthol.....	47
Figure 22 : résultat de criblage.....	48
Figure 23 : évolution de l'activité antifongique.....	52
Figure 24 : courbes représentent l'évolution de l'activité antioxydante de la Vc et He en fonction de l'absorbance.....	54

Figure 25: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	55
FIFURE 26 : Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations D'HE de la menthe.....	55
Figure 27 : Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de vitamine C.....	56
Figure 29 : Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations croissantes des champignons.....	58
Figure 30 : Evolution du taux de lipides totaux en fonction des concentrations Croissantes des champignons.....	59

Sommaire

-Liste des abréviations

-Liste des figures

-Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

Partie bibliographique :

Chapitre 1 : plantes aromatique et huiles essentielles.....4

1.plante aromatique :4

1.1. Définition :4

1.2. Les plantes aromatiques en Algérie :.....4

2. les huiles essentielles :6

2.1. Définition:6

2.2-histoire et origine :6

2.3. Marché des huiles essentielles :7

2.4. Domaines d'utilisation des huiles essentielles7

2.5. Localisation des huiles essentielles dans la plante9

2.6. Composition chimique.....10

2.7. Propriétés physico-chimiques13

2.8. Procédés d'obtention des huiles essentielles14

2.9. Conservation des huiles essentielles17

2.10. Critères de qualité18

2.11. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles19

Chapitre 2 : Les moisissures

1-	Généralité	20
2-	Morphologie et structure.....	21
3-	Classification.....	21
4-	Habitat et pouvoir pathogène	21
5-	nutrition et reproduction.....	22
	5-1- Facteurs nutritifs	23
	5-2- Modes de reproduction.....	23
6-	Isolement des moisissures.....	24
7-	Identification des moisissures	24
	7-1- Identification morphologique	25
	7-2- Identification génétique	25

Chapitre 3- Activités biologiques des huiles essentielles

1-	Activité antioxydante	26
2-	Activité antibactérienne	26
3-	Activité antifongique	26
4-	Activité pharmacologique.....	26
5-	Toxicité des huiles essentielles.....	29

PARTIE MATERIEL ET METHODE

1-	Matériel végétal.....	32
	1-1- la menthe.....	32
	1-2- Classification botanique.....	32
	1-3-description botanique.....	32
	1-4- caractéristiques médicinales et utilisation.....	33
2-	Extraction des huiles essentielles	
	2-1- Technique de l'hydrodistillation	33

2-2- Procédé d'extraction	33
2-3-Conservation de l'huile essentielle obtenue	34
4 Analyse physique	34
4-1- le rendement	34
4-2- L'indice de réfraction	35
4-3- Mesure de pH	35
4-4- Mesure de densité.....	36
5- Analyse chimique.....	36
6 - Criblage	
6-1-Principe.....	37
6-2- Macération	37
7- Analyses biologique	
7-1- Activité antifongique.....	38
7-2- Activité antioxydante.....	40
8 - Dosage des protéines et lipides	41

PARTIE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

1 L'huile essentielle	44
2- Analyse physique	44
2-1- Le rendement	44
2-2- L'indice de réfraction.....	45
2-3- Ph	45
2-4- La densité	45
3- Analyse chimique par CPG	46
4- Criblage des flavonoïdes et des tanins.....	48
5- Activités biologique	49

5-1- Activité antifongique	49
5-2- Activité anti-oxydante	53
6- Dosage des protéines et lipides	57
- Conclusion générale.....	60
- Références	65
- Annexes.....	68

Introduction :

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. [3]

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux. [3]

La popularité dont jouissent depuis longtemps les huiles essentielles et les plantes aromatiques en général reste liée à leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, tonifiantes, stimulantes, et calmantes. [25]

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur coût de production. [26]

L'homme a pensé à protéger ses denrées stockées. Empirique au départ, cette protection a connu d'énormes progrès au cours du siècle dernier, et s'est améliorée considérablement avec la découverte et l'utilisation des pesticides organiques de synthèse. Ces derniers ont rendu d'énormes services à l'humanité dans la lutte contre les ravageurs mais leur utilisation anarchique pendant plus d'un Demi-siècle a engendré depuis quelques années des effets néfastes considérables incitant les scientifiques à rechercher des alternatives de lutte pour remplacer les pesticides organiques de synthèse par des biopesticides végétaux biodégradables et respectueux de l'environnement. [25]

L'huile essentielle de la menthe poivrée occupe à elle seule la 6^{ème} place avec une production mondiale estimée à 2092 tonnes/an. Cette place est appelée à se promouvoir davantage, vu l'évolution positive de la demande mondiale de produits naturels au détriment de ceux de synthèse et vu aussi la diversité de leurs domaines d'applications. [21]

L'Algérie est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique,

agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes. Ces plantes aromatiques sont, donc, la source des huiles essentielles. [23]

Dans le but de faire connaître les effets bénéfiques de l'huile essentielle; on a choisi d'étudier l'huile essentielle de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) de la région de Tidis (Constantine, Algérie), on présente dans ce mémoire les différents caractères physico-chimiques de notre HE et ces effets sur des souches fongiques à fin de mettre en évidence son influence sur les produits alimentaires consommés par l'homme (industrie agro-alimentaire), ainsi notre environnement.

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : plantes aromatique et huiles essentielles

1. Plante aromatique:

1.1. Définition :

Ensemble de plantes susceptibles qui donnent des arômes et des huiles essentielles que l'on peut en extraire. [49]

L'aromathérapie est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes. Ce mot vient du latin « *aroma* » signifiant odeur et du grec « *therapeia* » signifiant traitement. Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odorifères. [49]

Figure1: quelques plantes aromatiques:



De nos jours entre 20000 et 25 .000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale. [49]

Les extractions de différents produits se font sous différentes formes dont les plus importantes sont : les tisanes, la gélule de la plante, suspensions intégrales de plantes fraîches et les huiles essentielles.

Les grands types des plantes aromatiques et médicinales utiles à l'homme peuvent être définis par leur principal usage. On peut citer : Plantes pour tisanes boissons hygiéniques et d'agrément, Plantes à usages cosmétiques, Plantes à usages aromatiques et condimentaires, Plantes à usages alimentaires, Plantes à usages industriels, et Plantes médicinales. [49]

1.2. Les plantes aromatiques en Algérie :

Selon Mokkaïem (1999), l'Algérie comprenait plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques. [50]

On peut classer les plantes médicinales comme une ressource naturelle renouvelable, c'est à dire, que l'apparition ou la disparition des plantes, se fait périodiquement et continuellement dans des saisons définies par la nature (la biologie de la plante, l'écologie, ...etc.). Ces ressources subissent des dégradations irréversibles, comme on l'assiste aujourd'hui en Algérie et comme l'estime Mokkaïem, (1999), que ces dix dernières années, des dizaines de plantes médicinales et aromatiques ont été déperdus. [50]

Les plantes médicinales comme les autres plantes subissent différents aspects de dégradation avec un gradient d'intensité variable selon plusieurs causes. [10]

(Dahia, 1994), signale que la principale cause de dégradation rencontrée dans la zone de Boussâda (zone steppique) est la désertification, qui est du essentiellement aux:

- Exploitation abusive des sols inaptes aux cultures.
- Déboisement des plantes (les arbres).
- Le surpâturage.

Tableau 01: Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle dans le monde [48]:

Importance de l'utilisation	pays
80 % de la population locale pour les soins primaires	Australie
49 % d'adultes	Chine
30 % à 50 % dans les systèmes de santé. Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 95 % des hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle	Inde
Largement utilisée. 2860 hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle	Indonésie
40 % de la population totale et 70 % de la population	Japon
72 % des médecins pratiquent la médecine traditionnelle	Vietnam
Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 30 % de la population se soigne par cette médecine	Pays occidentaux
<p>La médecine traditionnelle ou complémentaire n'est pas intégrée dans les systèmes de soins modernes</p> <p>* France : 75 % de la population a recours à la médecine traditionnelle au moins une fois</p> <p>* Allemagne : 77 % des cliniques pratiquent l'acupuncture</p> <p>* Etats-Unis : de 29 % à 42 % de la population utilisent la</p>	

2.les huiles essentielles :

2.1. Définition:

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées " essences ", sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux. Elles diffèrent des huiles fixes (huile d'olive,...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique.

l' AFNOR (Association française de la normalisation) définit l' huile essentielle comme : « Produit obtenu à partir d' une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques, l'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». [1, 2]

2.2-histoire et origine:

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil...), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Aztèques, Mayas, Incas : bois de Hô, sassafras) et en Afrique (encens, myrrhe, ravensare), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age.

A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'extraction des huiles essentielles par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Au début du XX^{ème} siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Mais les véritables «pères» de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses disciples. R.M. Gattefossé, pionnier de la parfumerie moderne se brûlant les mains lors d'une explosion dans son laboratoire, a le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie se guérit avec une rapidité Déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés.

L'aromathérapie moderne était née. Toutefois, malgré son incontestable efficacité, l'aromathérapie ne reçoit pas des médecins, l'accueil qu'elle était en droit d'attendre. La concurrence des laboratoires de produits chimiques de synthèse, financièrement beaucoup plus puissants, et une mauvaise utilisation des HES. suite à une méconnaissance des différentes variétés pour une même espèce sont les raisons de l'absence d'utilisation de l'aromathérapie à cette époque.

Aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche) et des chercheurs, des pharmaciens ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles.

2.3. Marché des huiles essentielles :

Dans le contexte actuel, la production et la commercialisation des huiles essentielles sont caractérisées par une compétitivité des produits provenant de pays en voie de développement et les pays industrialisés. La situation de la demande est complexe [47]

Tout projet de production d'huiles essentielles pour les marchés régional et international doit considérer avec attention l'évolution de la demande et les tendances de prix pendant une certaine période. Dans le contexte de la mondialisation, la concurrence est rude, il est difficile d'aborder ce marché et de s'y maintenir. Il est donc facile d'être éjecté d'où le souci de vouloir pénétrer ce marché en disposant des produits compétitifs conformes aux normes recommandées. Il est donc judicieux de choisir les plantes qui fournissent les huiles essentielles et d'autres extraits aromatiques très recherchés sur le plan mondial. [47]

Dans les vingt dernières années, il y a eu une augmentation significative des applications des huiles essentielles dans les parfumeries et les industries cosmétiques. Cependant, dans la même période, les huiles essentielles synthétiques ont pris le monopole au détriment des huiles naturelles, surtout dans le secteur de la parfumerie. Un producteur des huiles essentielles devrait analyser le marché, l'évolution des prix en fonction de l'offre et de la demande au niveau mondial. Malheureusement, cette approche est souvent difficile à cause de manque de l'accès à l'information actualisée d'ordre économique dans ce domaine. Les données disponibles sont consignées dans les paragraphes suivants, elles datent de la fin du siècle dernier et illustrent comment le secteur des huiles essentielles est un générateur des revenus non négligeable.

La production mondiale des huiles essentielles est estimée à environ 50 000 tonnes et le marché représente 700 millions de dollars (Basset, 1995 ; Meyer, 1997 ; Verlet, 1997). Près de 65 % de la production mondiale provient de l'extraction de la partie d'arbres ou arbustes cultivés ou présents à l'état sauvage dans la nature floristique. Les plantes non arbustives qui représentent le reste de la production de 35 % sont en majorité cultivées. [35]

2.4. Domaines d'utilisation des huiles essentielles :

2.4.1. Dans les industries agro-alimentation :

Les huiles essentielles sont utilisées comme condiments, aromates ou épices. C'est le cas des essences de gingembre, de girofle, de vanille, de basilic, de poivre, de citrus. Les huiles essentielles extraites de citrus, par exemple, trouvent leur utilisation dans la confiserie, les sirops, les biscuiteries. On note leur intégration aussi dans les boissons, les produits laitiers, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries ainsi que la nutrition animale. [17]

2.4.2. La médecine et l'industrie pharmaceutique :

- Les propriétés pharmacologiques des HE leur confèrent un pouvoir antiseptique contre les bactéries, champignons et levures, en plus des propriétés bactériostatiques, bactéricides, vermicide, fongicides, antiseptiques, insecticides. Les HE de thym, girofle, lavande, eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus Antiseptique que le phénol. [17, 23]

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

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

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

Figure 2: des médicaments à base d'HE: [3]



2.4.3. L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique:

Utilise fréquemment les huiles essentielles. La cosmétique est le secteur des produits d'hygiène naturels et synthétiques pour consommateurs. Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires [33]. On les retrouve aussi dans les préparations pour bains. Intégrées aux huiles de massage, leur teneur ne doit pas passer 3 à 4%. Le menthol, par exemple, trouve une utilisation variée dans les produits tels que les dentifrices, mousses, nettoyantes, aliments, cigarettes et des préparations pharmaceutiques orales. L'huile de menthe poivrée est la troisième saveur mondiale, derrière les saveurs vanille et citron. [3, 7]

Figure 3: utilisation d'HE dans la cosmétique:



2.4.4. Dans diverses industries:

Ce sont surtout des industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des HE) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc.... [2]

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

2.5. Localisation des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule.

Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité Extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air. [13]

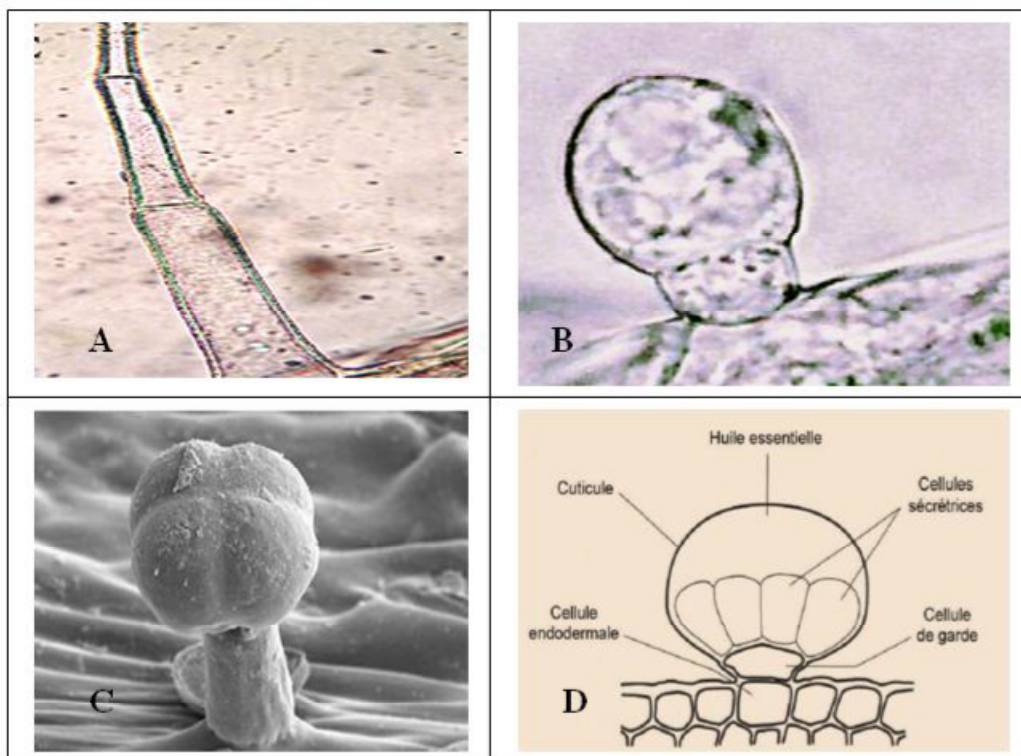
- Les poils sécréteurs ou trichomes qui peuvent se présenter sous quatre formes: ils peuvent se composer de plusieurs cellules sécrétrices associées pour constituer un plateau porté par un pédicelle* court, poils peltés*, poils capités* à pieds court ou Lo ou bosselé.

Les poils sécréteurs peuvent être externes ou bien internes, comme dans les divers eucalyptus ; Les trichomes glandulaires constituent un autre type de structure de sécrétion et/ou d'accumulation des CTV. Ces trichomes ont particulièrement été étudiés chez certaines familles botaniques telles que les Solanacées et les Lamiacées [24]

- Les cellules épidermiques: il s'agit de cellules plus petites que les autres cellules épidermiques. Elles sont davantage perméables car leur paroi ne contient pas de cutine ; ce type de cellules se rencontre généralement dans les pétales de fleurs. Chez la rose.

- Les poches sécrétrices: leur genèse débute par la division d'une cellule Parenchymateuse en quatre cellules, qui forment en leur centre une poche. Dès lors, il existe deux voies d'évolution pour cette poche: soit les cellules entourant la poche, continuent à se diviser tout en formant une seule rangée tout autour; la poche est qualifiée de schizogène ; soit les cellules, entourant la poche, vont se diviser et s'organiser pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne formant alors une poche schizolysigène.

Figure 4: Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A): poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B): trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C): trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D): structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris*:



2.6. Composition chimique:

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe, Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable, d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. De masse moléculaire relativement faible (terpènes: 136 u.m.a, terpinols: 154 u.m.a, et sesquiterpènes: 200 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives. HE est constitué de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle. [17]

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [29]

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où il apparaît clairement comment les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques.

Terpènes: $R-HC=CH-R$

-Alcools terpéniques: $R-OH$

- Cétones: R_1-CO-R_2

- Aldéhydes : $R-CHO$

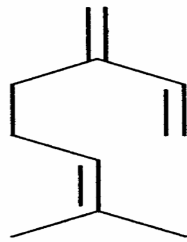
- Ester $R-COO-R-$

- Ethers: $R-O-R$

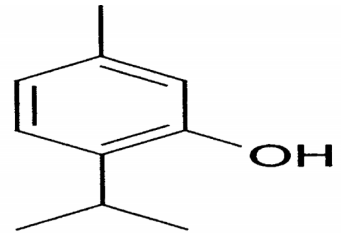
L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique.

1. Monoterpènes:

Molécules hydrocarboné sont des composés essentiels, acycliques, monocycliques, bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Citrus, Térébentine).



Myrcène



Thymol

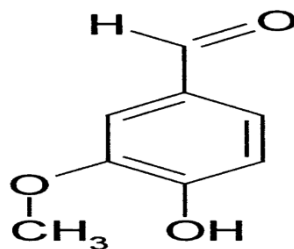
2. Sesquiterpènes:

L'allongement de la chaîne (fpp) accroît le nombre de cyclisations possibles. Ainsi, plus d'une centaine de squelettes différents a été décrit.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils(CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [29]

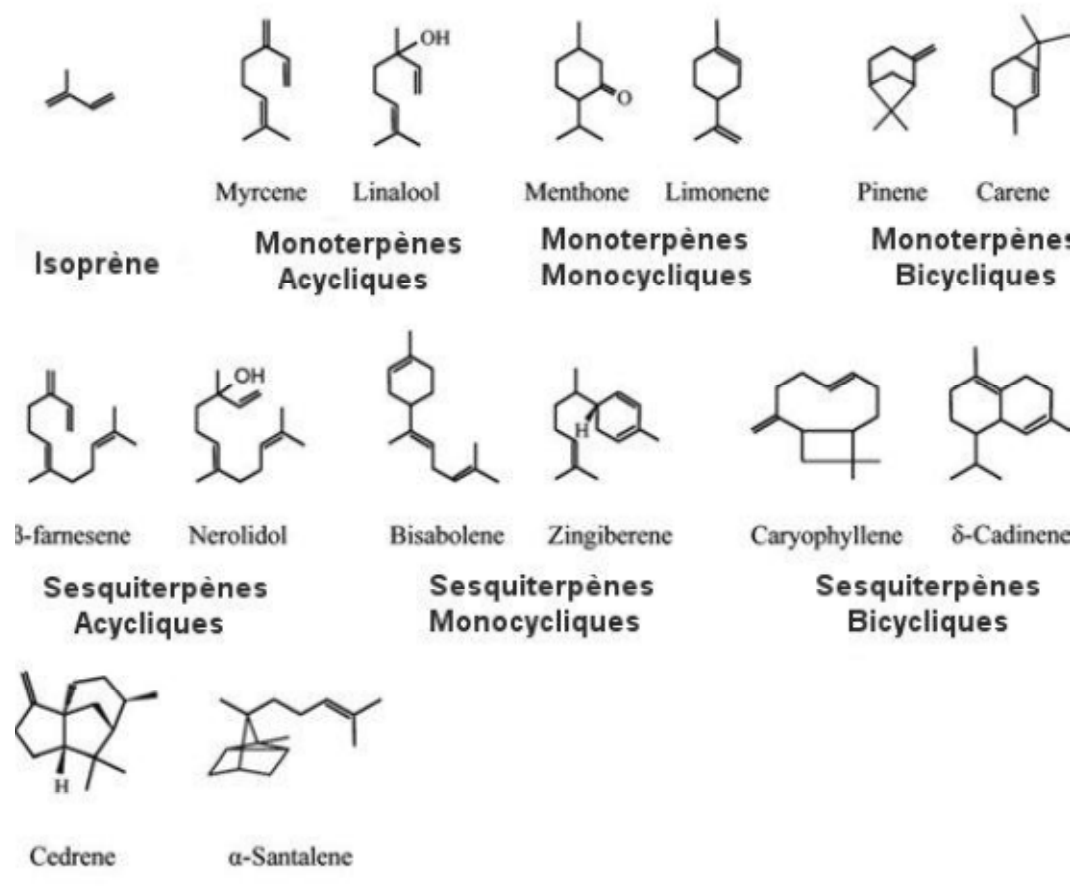
Composés aromatiques :

Dérivés du phénylpropane (C6-C3). Ils sont beaucoup moins fréquents que les molécules volatiles. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones.



Structure de la vanilline

Figure 5: Schémas des principales formes de squelettes carbonés des mono et sesquiterpènes (modifié d'après Dudareva, Negre et al. 2006):



Composés d'origines diverses:

Certains composés aliphatiques de faible poids moléculaire sont entraînés lors de l'hydrodistillation des HE à savoir les carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters. [17]

2.7. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène [7]. Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées. [20]
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.

- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau. [17]
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux.

2.8. Procédés d'obtention des huiles essentielles:

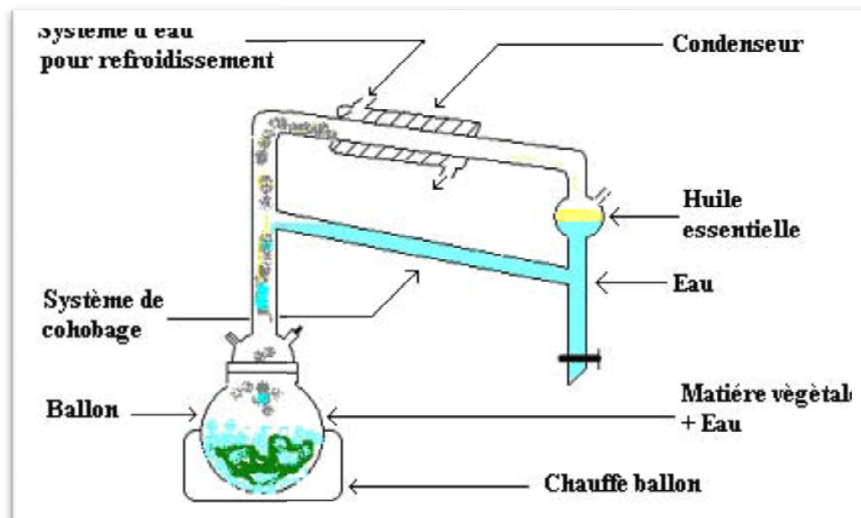
2.8.1. La distillation:

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. [34]

a) l'hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition (Figure 6). Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

Figure 6: Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle: [39]



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

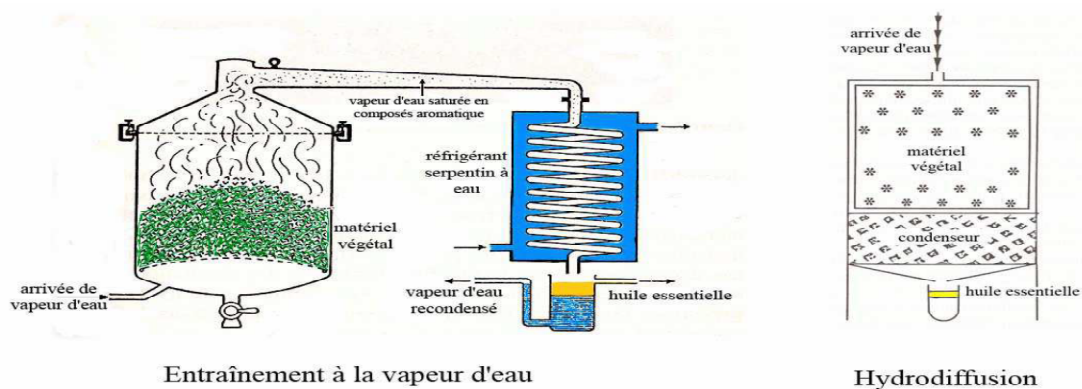
Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur

d'eau La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [25].

c) L'hydrodiffusion:

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

Figure 7: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante [5, 11]:



2.8.2 Extraction par micro-ondes:

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. [35]

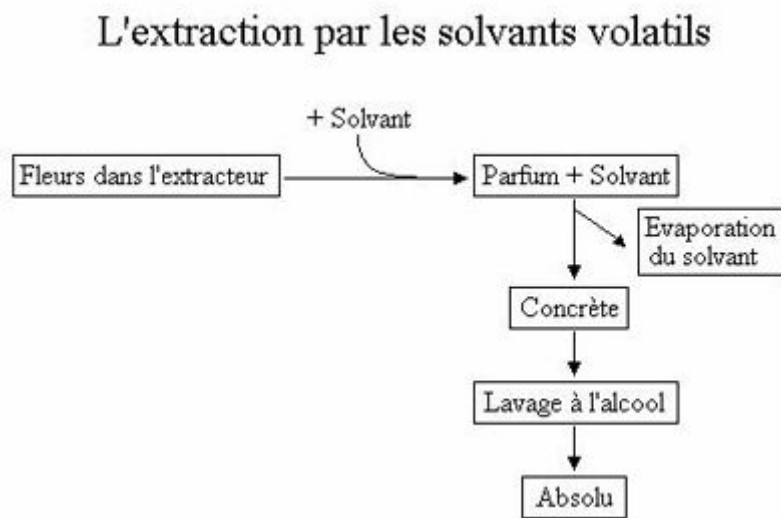
2.8.3. L'extraction par solvants volatils:

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu

est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense: le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet sont les principales. [20]

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux microondes et aux ultra-sons.

Figure 8: L'extraction par solvants volatils [5, 11]:



2.8.4. Expression à froid: [32]

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

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

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

Alors que jusqu'à une époque récente, l'huile essentielle constituait le produit majeur obtenu à partir des fruits de Citrus, désormais c'est le jus qui représente le produit le plus important, l'huile essentielle étant devenue un sous-produit de la production de jus de fruits d'agrumes. De plus l'expression de type manuel dite « à l'éponge » a laissé place à des procédés beaucoup plus industrialisés et mécanisés afin de diminuer les coûts, d'augmenter les rendements et de préserver le fruit en vue de l'extraction de son jus. Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans la majeure partie de ces procédés peut altérer les qualités des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes. C'est pourquoi les constructeurs cherchent en permanence à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors de telle extraction.

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

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

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

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

2.8.5. Extraction par CO₂ super critique: [28]

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

2.9. Conservation des huiles essentielles : [32]

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

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

2.10. Critères de qualité :

L'huile essentielle utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité: [25]

- L'espèce botanique:

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

-L'organe producteur :

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

-L'origine géographique.

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

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

- Le mode de culture :

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

- Le chémotype : [10]

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

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

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

-Le mode d'extraction.

2.11. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles :

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

11.1. Chromatographie en phase gazeuse : [40, 41]

Elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. [41]

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

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

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

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

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes. [42]

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

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

Chapitre 2 : Les moisissures :

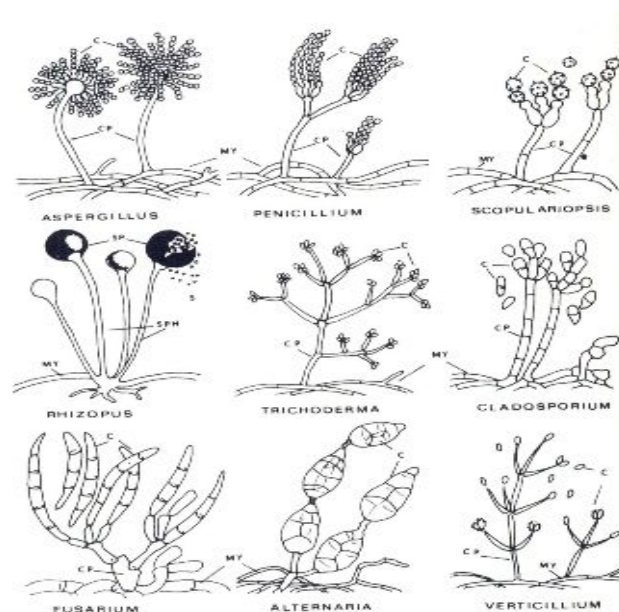
1. généralité :

Le mot Moisissure est un terme très général du vocabulaire courant en français qui ne correspond pas exactement à un niveau de classification scientifique. C'est-à-dire qu'il s'agit d'un nom vernaculaire dont le sens est ambigu en biologie car utilisé seulement pour désigner certains microorganismes au développement filamenteux. Le plus souvent il s'agit de champignons de la classe des mycètes, bien que le nom ait été longtemps employé pour désigner des espèces d'un règne assez éloigné et aujourd'hui distingué, comme celui des chromistes, plus proches des végétaux que des champignons. Il existe des milliers d'espèces de moisissures. Ce sont en général des organismes pluricellulaires. [45]

La plupart des moisissures sont hétérotrophes, c'est-à-dire que ces organismes fondent leur développement sur l'assimilation de composés organiques produits par d'autres espèces. Cependant ce n'est pas toujours le cas, certaines espèces possèdent un métabolisme mixte qui leur permet également de se développer soit en symbiose avec une autre espèce, soit en synthétisant de façon autotrophe les produits organiques à partir de nutriments minéraux et d'une source d'énergie ; nous pouvons citer les moisissures chromistes capables d'une forme limitée de photosynthèse, et certaines moisissures acidophiles ou basophiles. [45]

2. morphologie et structure :

Figure 9: structure des moisissures:



L'organisation cellulaire des champignons est appelée le thalle. Chez les champignons microscopiques, le thalle peut être unicellulaire (levures) ou filamenteux (moisissures). Certaines levures sont toutefois capables de former des structures filamenteuses (pseudomycélium) dans certaines conditions (*Candida*, *Trichosporon*). Les moisissures sont pluricellulaires : les filaments, plus ou moins ramifiés, sont appelés hyphes. L'ensemble des hyphes constituent le mycélium.

a. Chez les Phycomycètes, les cellules ne sont pas séparées par des cloisons transversales : le thalle est dit coenocytique (ou « siphonné »). Mucorales (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*)

b. Chez les Septomycètes, le thalle est cloisonné (ou « septé »). Dans ce cas, des perforations assurent la communication entre les cellules. *Penicillium*, *Aspergillus*.

3. classification :

Les levures et les moisissures appartiennent au règne des Mycètes (Fungi). La classification est basée sur le cloisonnement des hyphes et des caractères morphologiques observés lors de la reproduction sexuée (rarement observée: l'identification au laboratoire repose sur l'observation des structures de reproduction asexuée).

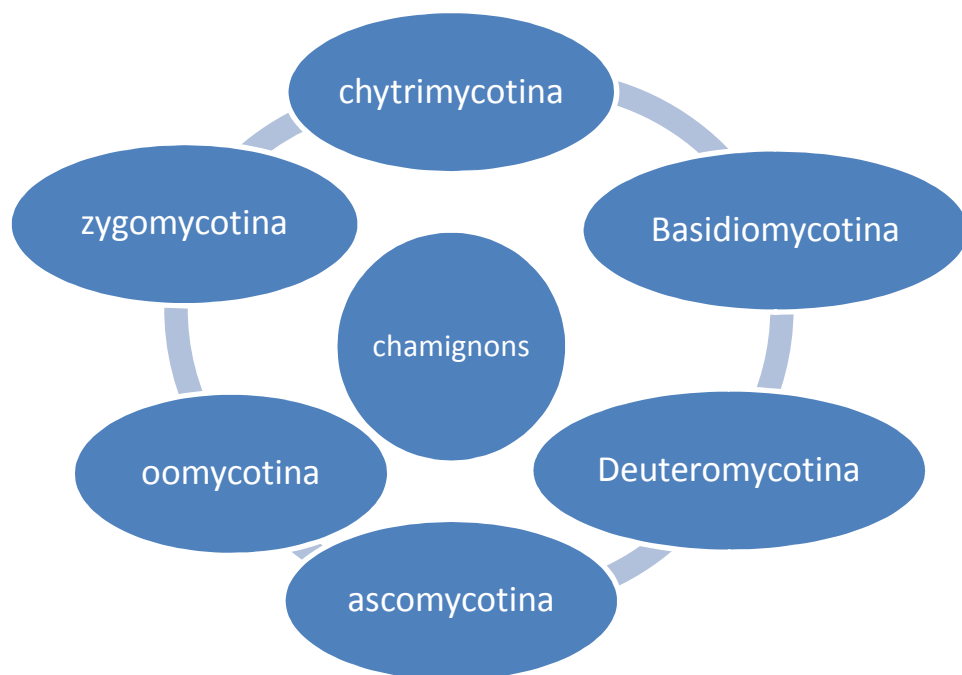
Tableau 02: classification et reproduction des champignons:

classe	cloisonnement	Reproduction sexuée	Exemples
Zygomycètes	Non	oui (zygospores)	Mucorales : <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Absidia</i>
Ascomycètes	Oui	oui (ascospores)	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i>
Deutéromycètes (Fungi imperfect)	oui	Absente (ou inconnue)	<i>Candida</i> , <i>Trichosporon</i> ; <i>Geotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i>

La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques. [18]

La classification de Kwon Chung et Bennett (1992) est la plus utilisée actuellement (Figure 6). On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces fongiques, plus de 1000 d'entre elles pouvant contaminer les aliments. [16]

Figure 10: Classification des champignons [30]:



4. habitat et pouvoir pathogène :

Les moisissures sont des micro-organismes saprophytes du sol, se retrouvant facilement grâce à leurs spores sur les aliments (notamment les fruits et les céréales, sur lesquels ils se développent) mais aussi sur les milieux de culture des laboratoires! Certaines produisent des mycotoxines (l'aflatoxine d'*Aspergillus flavus* est la plus connue), d'autres des antibiotiques (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*...) [45]

Les *Penicillium* sont aussi utilisés dans l'industrie alimentaire (fromages, saucissons secs...) Les êtres humains sont donc en contact quotidien avec ces champignons. Malgré cela, les pathologies liées à ces moisissures ne sont pas fréquentes, et rencontrées chez les personnes immunodéprimées : ce sont donc des micro-organismes pathogènes opportunistes. Les voies de pénétration dans

l'organisme humain sont principalement aérienne (respiratoire) d'une part, cutanée (lorsqu'une blessure est contaminée) d'autre part. [45]

- *Mucor* atteintes pulmonaires, cérébrales
- *Rhizopus* atteintes cutanées, disséminées...
- *Aspergillus* atteintes pulmonaires, sinusites, otites...
- *Fusarium* atteintes cutanées chez les brûlés, disséminés...
- *Penicillium* généralement non pathogènes sauf *Penicillium marneffei* (atteinte disséminée).

5. nutrition et reproduction :

5.1 Facteurs nutritifs :

5.1.1 Source de carbone

Les mycètes utilisent des matières organiques comme source de carbone et énergie. Ils tirent ce carbone par saprophytisme, symbiose ou parasitisme. Les mycètes utilisent la glycolyse comme métabolisme aérobie pour dégrader les hydrates de carbone. Certains peuvent utiliser des fermentations à des taux bas d'oxygène. Récemment, des mycètes anaérobies vrais ont été découverts dans le rumen du bétail. Ces mycètes présentent un métabolisme énergétique proche de certains Protozoaires parasites [38]

5.1.2 Source d'azote:

Les mycètes incorporent l'azote par hétérotrophisme. Ils ne peuvent assimiler l'azote gazeux mais peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium et certains acides aminés par absorption directe à travers la membrane. Des sources complexes d'azote, comme les peptides et les protéines, ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur dégradation par des protéases en acides aminés. [38]

5.1.3 Source d'éléments minéraux et vitamines:

Le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium et le soufre constituent des sels minéraux requis par les mycètes. Les mycètes ont la possibilité d'accéder à des réserves de phosphore en sécrétant dans le milieu extracellulaire des enzymes phosphatases. Le fer est relativement insoluble et donc pas facilement assimilable ; mais les mycètes sont capables de synthétiser des sédérophores ou des acides organiques qui peuvent chélater le fer ou modifier sa solubilité. Certains mycètes peuvent avoir besoins de vitamines préformées, comme par exemple de la thiamine et de la biotine, ainsi que des stérols, de la riboflavine, de l'acide nicotinique et folique. [45]

5.2 Modes de reproduction :

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores. [37]

Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres êtres vivants doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats [45] Les champignons se reproduisent de deux manières:

- Par voie sexuée: suite à la fusion de deux cellules gamétiques.
- Par voie asexuée ou végétative, la plupart d'entre eux étant rencontrés dans le groupe des imparfaits. [19]

- **5.2.1. La reproduction sexuée :**

Des moisissures se reproduisent selon un cycle de reproduction sexuée. La reproduction sexuée implique la production d'organes sexués et de gamètes, la fusion des gamètes ou des organes sexués suivie par la fusion nucléaire ou caryogamie et la méiose, le développement des organes de fructification. [31]

Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. La sexualité n'existe que chez certaines espèces, pour d'autres elle n'a jamais été mise en évidence, pour d'autres elle est inconstante ou rare. [26]

- **5.2.2 La reproduction végétative :**

Elle est beaucoup plus répandue que la précédente, et si elle ne fait pas intervenir de transformation génétique, elle joue un grand rôle dans la dissémination des espèces. Elle se fait, soit par une fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées. [7]

Chez les moisissures, plusieurs types de spores de reproduction végétative peuvent être produites: arthrospores (issues de la septation de la paroi cellulaire), sporangiospores (formées dans un sporange à l'extrémité d'un hyphe), conidiospores (produites à la périphérie des hyphes), blastospores (formées par un bourgeonnement de surface d'une cellule végétative). [7]

6. isolement des moisissures

Le choix des milieux de culture est aussi déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore du produit à analyser. Trois catégories de milieux peuvent être distinguées : les milieux de routine, peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures ; les milieux sélectifs adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces à écologie particulière et difficile à mettre en évidence avec un milieu ordinaire ; les milieux différentiels utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles.

7. identification des moisissures :

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. [18]

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification. [18]

7.1 Identification morphologique :

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) [14]

7.2 Identification génétique:

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturelles et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique. [11, 32]

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium*. [11]

De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes (Niessen, 2007). Si à l'heure actuelle les outils d'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique dans les aliments [39]

Chapitre 3 : activités biologique et pharmacologiques des huiles essentielles :

1. Activité antioxydante :

Le pouvoir antioxydant de ces huiles 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 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 autocatalytique 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 complication des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc. [33]

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 .

L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuables à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cinéole, le géranial/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: a-terpinène, y-terpinène et l'aterpinolène [22]

2 Activité antibactérienne :

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules.

Le mode d'action des HES 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.

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée. Les HES peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable.

3. Activité antifongique :

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou et al., 1988). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative. Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique : Phénols Alcools Aldéhydes Cétones Ethers Hydrocarbures Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol).

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de Chao et al. (2000), ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

4. activité pharmacologique :

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer [Butterfield, 2002], l'artériosclérose et le cancer [Gardner, 1997]. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, BHT, etc. [23]

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants [22]. Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes [6]

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite [33].

Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* [33] et de son composé principal, l'alpha-terpinéol [Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de geranium, ainsi que le linalol et son acétate [Peana et al., 2002] ont montré une activité anti-inflammatoire sur des oedèmes de pattes de souris induit par le carraghénane.

Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires. Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux [22].

Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer [8].

Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimiopréventive a été mise en évidence. L'huile essentielle d'ail, par exemple, est une bonne source de composés sulfurés reconnus pour leur effet préventif contre le cancer [Milner, 2001; Milner, 2006]. Le diallyl sulfide, diallyl disulfide et le diallyl trisulfide en sont des exemples. Ces composés activent, chez le rat, les enzymes intervenant dans le processus de detoxification hépatique de phase I (désagrégation des liaisons chimiques qui relient les toxines carcinogènes les unes aux autres) et de phase II (liaisons des toxines libérées à des enzymes détoxifiantes telle la glutathione S-transférase) [Wu et al., 2002]. Un autre exemple est la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines huiles essentielles, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathione S-transférase chez la souris [Ahmad et al., 1997] et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(a)pyrène au niveau des poumons de la souris [Zheng et al., 1992].

Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain [Lee *ét al.*, 2005].

Il existe d'autres composés volatils qui ont montré une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (gliomes, cancer du côlon, du poumon, du foie, du sein, etc.) [22].

Le géraniol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les huiles essentielles, diminue la résistance des cellules cancéreuses du côlon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux. De ce fait, le géraniol potentialise l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du 5-fluorouracil [Carnesecchia *et al.*, 2002; Carnesecchia *et al.*, 2004]. L'huile essentielle de sapin baumier et un de ses composés, l'a-humulène, ont montré une activité anticancéreuse significative sur plusieurs lignées cellulaires ainsi qu'une faible toxicité envers les cellules saines [Legault *et al.*, 2003].

L'activité anticancéreuse du d-limonène, le composé principal des huiles essentielles de Citrus a été prouvée à plusieurs reprises, en particulier au niveau du cancer de l'estomac et du foie [Uedo *et al.*, 1999]. Un dernier exemple est l'a-bisabolol. L'activité antigliomale de cet alcool sesquiterpénique présent en grande majorité dans l'huile essentielle de camomille (*Matricaria*) a récemment été mise en évidence [Cavalieri *et al.*, 2004].

5. Toxicité des huiles essentielles :

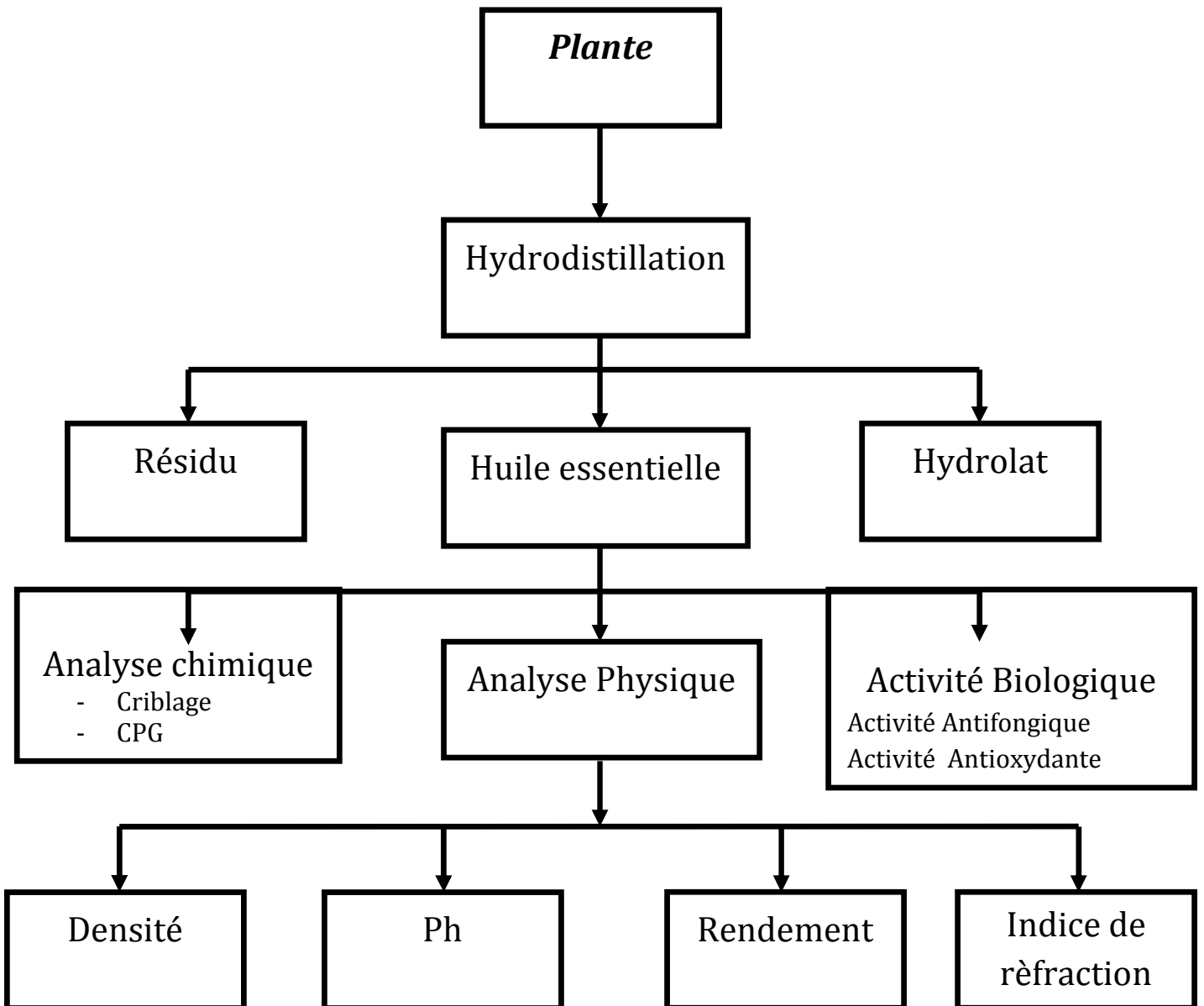
Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006).

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature : En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal) (Bruneton, 1993). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles.

Certains auteurs (Franchomme *et al.*, 1990 ; Mailhebiau, 1994) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxique selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande.

Matériel et Méthodes

Schéma qui représente le Protocole expérimental



1-matériel végétal :

1.1. La menthe :

Les Lamiacées ou Labiatae (Lamiacées, Labiacées ou Labiées) [28] sont une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6 000 espèces et près de 210 genres. On trouve la menthe poivrée qui est une plante herbacée. Ce type de menthe serait issue d'un croisement entre *Mentha aquatica* et *Mentha spicata*.

1.2. Classification botanique:

Tableau 03: classification de la menthe poivrée [51]:

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha piperita</i>

Figures 11: feuilles et fleurs de la menthe poivrée [40]



1.3 .Description botanique:

La menthe pousse sur des sols frais et humides riches en humus jusqu'à 1.800 m d'altitude. Plante commune dans toutes les régions tempérées du monde.

Il s'agit d'une plante vivace à rhizome long, rampant, traçant, chevelu. La tige, de 50 à 80 centimètres, dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un très beau vert et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes. [40]

Les fleurs, violacées, forment des épis très courts, ovoïdes, à l'extrémité des rameaux. Le fruit, divisé en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquante et rafraîchissante. [26, 27, 40]

1.4. Caractéristiques médicinales et utilisation:

La menthe est riche en vitamine C, en fer, en manganèse, en antioxydants; elle a des vertus digestives, antiseptiques, stimulantes et antispasmodiques. [4]

La menthe poivrée est parfois considérée comme « la médecine la plus ancienne du monde », avec l'évidence archéologique plaçant son utilisation au moins dès des dix millièmes il y a des années. En thérapeutique, la menthe est utilisée contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, la mélancolie, l'hystérie, les troubles de la vue, elle présente aussi des propriétés médicales, on cite à titre d'exemple : stimulante du système nerveux, tonique, stomachique, antiseptique, analgésique et vermifuge. [4, 20, 40]

On l'utilise aussi contre les parasites, les tiges et les fleurs de la menthe sont brûlés pour chasser les puces des matelas et des animaux domestiques, on peut aussi placer les sachets de menthe auprès des sacs de grains et de fromage pour chasser les rongeurs.

Dans le domaine alimentaire, on peut citer les besoins d'agrément, les crèmes, les chocolats, les bonbons, les pâtes à mâcher, les desserts, etc.

La menthe poivrée peut également être trouvée dans quelques shampooings et savons, qui donnent aux cheveux un parfum de menthe et produisent une sensation de refroidissement sur la peau. [4, 20, 40]

2. extraction des huiles essentielles :

2.1-extraction par hydrodistillation :

L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger.

Figure 12: montage d'hydrodistillation (clèvenger):



2.2-Procédé d'extraction:

-100 g de la partie aérienne de la plante fraîche sont mises dans un ballon à fond rond de 250 ml additionnées de 100ml d'eau distillée.

- L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 2 heures. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide.

3-Conservation de l'huile essentielle obtenue :

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. C'est pour cela nous les avons conservées à une température voisine de 4 °C, dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

3. analyse physique :

3.1. Le rendement :

3.1.1 Définition :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile extraite et le poids de la plante à traiter.

3.1. 2. Méthode de mesure [21] :

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = [PA / PB] \times 10$$

R : Rendement de l'huile en %.

PA : poids de l'huile en g.

PB : poids de la plante en g.

3.2. Indice de réfraction :

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé. L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.3356, et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684. Ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée.

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre (figure 13): qui est un instrument optique servant à déterminer l'indice de réfraction d'une substance c'est-à-dire la mesure dans laquelle la lumière est déviée en traversant la substance.

Figure 13: le réfractomètre:



3.3. Mesure de pH:

pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène, mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution.

Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7. [21] Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.

Figure 14: Ph mètre:



3.4. Mesure de densité:

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume.

Méthode de mesure :

C'est le rapport entre un certain volume d'huile essentielle et la masse de ce même volume. La densité est ainsi obtenue par g/cm³.

4. analyse chimique :

(Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse) : [28]

* Le gaz vecteur est l'azote d'un débit de 0.3ml/min.

* La colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP-Chirasil-Dex CB fusedsilica WCOT, de 25m de longueur et de 0.25mm de diamètre intérieur. Epaisseur de la phase stationnaire : 0.25µm.

* La programmation de la température de la colonne est comme suit : la température initiale d'injection est de 70°C pendant 2.50mn, puis s'élève par palier de 15°C/mn à 240°C pendant 30mn.

* Le détecteur utilisé pour cette analyse est de type FID, température 250° C. L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés.

Le temps de sortie de chaque pic, le « temps de rétention », caractérise qualitativement la substance concernée. L'aire limitée par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé. [28,]

Figure 15: appareillages CPG:



Colonne

Gaz vecteur

5. Criblage :

Criblage des flavonoïdes et des tanins

5-1 Le principe :

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal, ce sont des composés poly phénoliques ayant une squelette de base en C6-C3 dans lequel C6 représente un noyau benzénique et C3 une chaîne carbonée à trois atomes de carbones, les composés flavonoïques sont réduites en présence d'un acide concentré et de magnésium le produit de réduction conduit à des anthocyanidines de couleur rouge.

Les tanins sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses. Ce sont des métabolites secondaires des plantes supérieures que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, fruits, etc.) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. Sur le plan chimique

5-2-macération :

La macération est l'opération qui consiste à laisser macérer les plantes dans de un solvant tiède. En fonction du type de plante, pour en extraire les principes actifs.

a-1 préparation des extraits bruts éthanoïques dans un erlen Meyer on ajoute 10 g de matériel végétal avec 60 ml d'éthanol ; l'ensemble est porté à reflux pendant une 24 heure

nous avons fait la filtration de ce mélange et finalement on obtient un extrait éthanoïque

Le filtrat est reparti dans 2 tubes le 1^{er} témoin et l'autre pour le test

Figure 16: extrait méthanolique de la menthe poivrée:



Test Wilstater pour les flavonoïdes.

Traité 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d' HCl concentré et 0,2 g de tournures de magnésium

La présence des flavonoïdes aglycones dans les extraits sont indiquées par le virement de la couleur vers l'orange ou le rouge brique.

Détection des tanins :

1,5 g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de MeOH 80 %. Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes. L'ajout de FeCl₃

1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (26). Le filtrat est ensuite réparti dans 2 tubes à essai, le 1^{er} tube servant de témoin. Le 2^{ème} pour le test.

6. Activités biologiques:

*** 6.1.activité antifongique :**

Culture des champignons dans l'infusoire :

-Mettre la paille du blé dans un bol et ajouter l'eau distillée ; laisser quelques jours (4j-7j).

-Technique d'isolement :

La préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly, 1968).
.des prélèvements successifs de 1 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes, ajoutés chaque fois à 9ml d'eau stérile, vont constituer la dilution 10⁻¹,10⁻²,.....pour

réaliser ces différents prélèvements il est primordial d'utiliser des pipettes stériles qui sont changées à chaque dilution.

-On dépose un volume de 1ml de chaque dilution dans les boites de petri et verser par-dessus le milieu sabouraud, quand les maintient dans les conditions suivantes :

Température : ambiante 27°C.

Durée d'incubation : 4j.

-Purification des échantillons :

La purification des souches est effectuée par prélèvement d'un morceau de champignon après culture en boite de Pétri sur le milieu de sabouraud. La souche est ensemencée au centre de la boite.

Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant. L'étude approfondie d'une souche est effectuée à partir d'une culture des spore (Guiraud, 1998).

Etude des caractères macroscopique :

Les caractères culturels ainsi étudiés sont :

- * Vitesse de croissance.
- * Couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps.
- * Structure du thalle.
- * Couleur de l'envers des colonies.
- * Présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien (exsudat).

Etude des caractères microscopiques :

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques. Elle nécessite le montage de préparations microscopiques (microscope optique couplé à un ordinateur), parfois une coloration du matériel à examiner et des mesures micrométriques sont nécessaires (Botton et al., 1990, Guiraud, 1998).

L'examen microscopique permet d'étudier les caractères suivants :

- * Hyphes cloisonnés ou non.
- * Mycélium diffus, épais, coloré, incolore.
- * Présence et type de spores sexuelles : oospore, zygosporé, ascospores et basidiospores.
- * Présence de spores asexuées : type et apparence.
- * Agencement des conidiophores et sporangiophores.

L'examen microscopique s'effectue sur des préparations à l'état frais, après fixation au lactophénol et après coloration à différents grossissements (x10, x40 et x100 pour l'étude des spores) (Guiraud, 1998 ; Smith, 2002).

Identification microscopique :

L'identification des moisissures est réalisée par examen de la culture sur milieux solides en boîte de Pétri. L'examen est effectué à l'œil nu, à la loupe et au microscope. Il est relativement facile d'identifier le genre mais il est beaucoup plus délicat de déterminer avec certitude l'espèce (Guiraud, 1998).

Traitements des échantillons par différentes doses de l'HE de *Mentha piperita* et Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha piperita*:

Le traitement des souches est effectué dans les boîtes de pétri, en se basant sur la méthode des puits dans un milieu solide (sabouraud), au milieu de la boîte de pétri, on dépose notre HE avec les doses suivantes: D1= 3.5, D2=5, D3=10.5 (dans différentes boîtes). On rajoute nos souches (qui contiennent des spores) et à l'aide du pipette pasteur (forme T), on effectue l'étalonnage des souches.

L'évaluation de l'activité antifongique de l'HE étudiée sur des souches tests et des souches isolées, a été appréciée selon la méthode de Moulari (2005).

***6.2.activité antioxydante :**

6.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (α -tocophérol). Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration.

6.2.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH :

1. Principe

La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH⁺ (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (Burits et Bucar, 2000).

2. Mode opératoire :

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Burits et Bucar, (2000) ; où 50 μ l de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations (200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml et 1000 μ g/ml) sont mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH(0.004%). Après une période d'incubation de 30minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine E a été également analysée à la même concentration pour

La comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine E et l'huile essentielle.

3. Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon Sharififar et al, (2007), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Tous les essais ont été effectués en triple .La cinétique des réactions de l'huile essentielle et de la vitamine E avec le DPPH• a été inscrite à chaque concentration examinée.

Les concentrations en huile essentielle et en vitamine E, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50% (Sharififar et al, 2007).

4. Détermination du temps d'équilibre TEC50

Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50. Ce temps est déterminé graphiquement (Sharififar et al., 2007).

7. dosage des protéines et lipides :

Figure 17: principaux matériels du dosage.



Spectrophotomètre

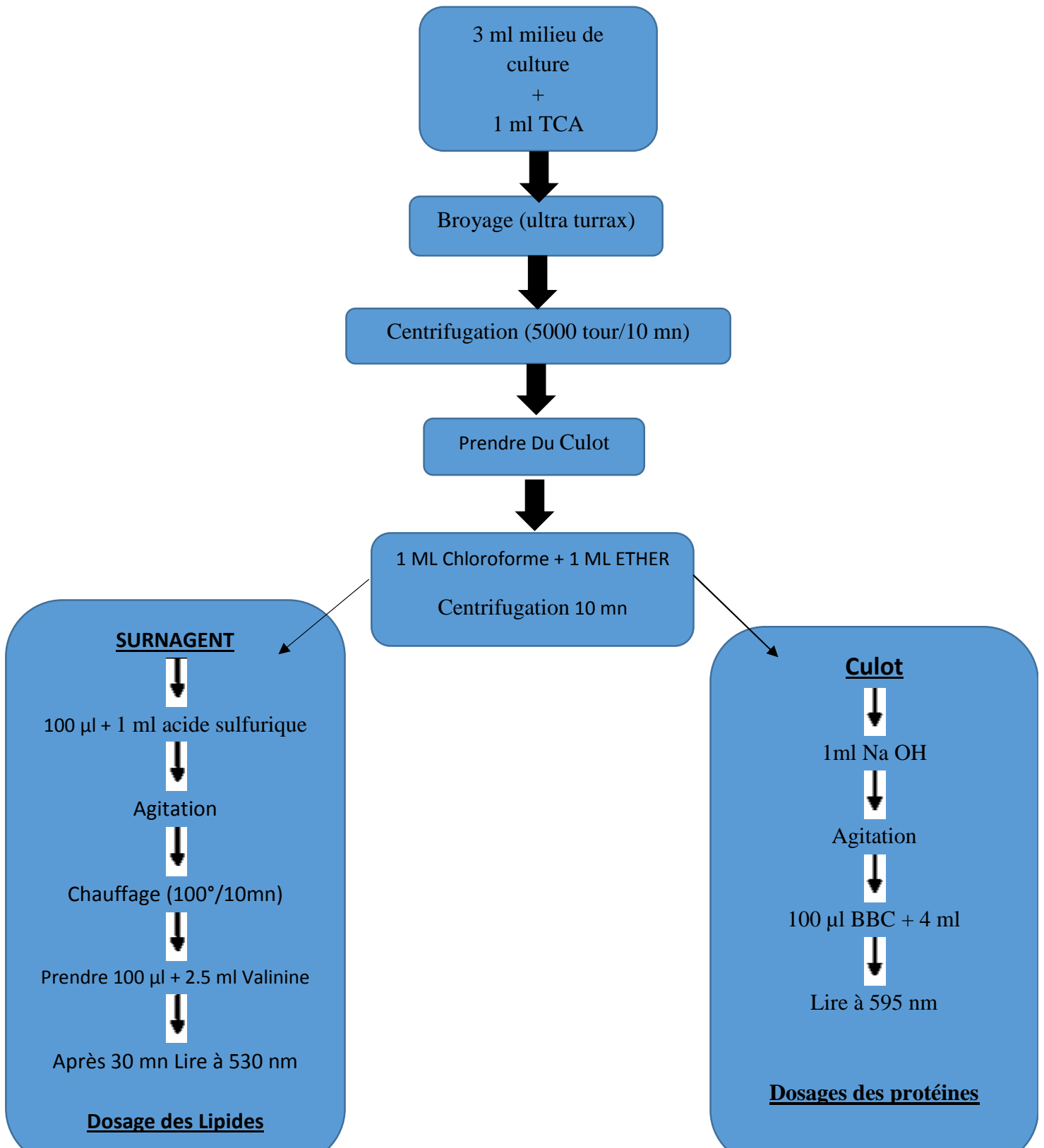


ultra turrax

Dosage des Protéines totales:

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de Bradford, (1976). Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de coomassie) sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques, cette fixation provoque un transfert de sa couleur qui passe du rouge au bleu. Ce changement de coloration est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par spectrophotomètre (JENWAY 3600) en utilisant l'Albumine Sérum bovine (BSA) comme standard.

Dosage des lipides :Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) qui utilise la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de la gamme étalon auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique (96 %). Après agitation et chauffage dans des bains à sec à 100 °C pendant 10 mn, puis refroidissement, 200 µl sont repris auxquels sont ajoutés 2,5 ml de la réactive vanilline. Une fois agités et mis à l'obscurité pendant 30 minutes, une coloration rose se développe dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 530 nm. Le plan suivant représente la méthode du travail de dosage par: (Bradford, 1976)



Résultats et Discussion

1. Description de l'huile essentielle obtenue :

La figure en dessous nous montre une photo de l'huile essentielle extraite

Figure 18 : huiles essentielles extraite :



Le tableau en 04 nous montre une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite de la menthe poivrée avec les normes d **AFNOR**

Tableau 04: les caractéristiques de notre huile essentielle extraite et celles de les normes AFNOR.

	aspect	couleur	odeur
Norme AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Caractéristique fraîche, plus ou moins mentholée selon l'origine
Huile essentielle étudiée	Liquide, mobile	Jaune pâle	Fraîche mentholé

Selon Le tableau 4 l'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile essentielle étudiée sont les mêmes pour les normes d **AFNOR**.

2. analyse physique :

2.1. Le rendement :

Il faut noter que le rendement des HE dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les pratiques culturales et la technique d'extraction.

Notre rendement R en huile essentielle est déterminé par rapport à 100 g des feuilles et tiges de menthe poivrée.

Tableau 05: résultat du rendement:

Rendement He étudiée	Norme AFNOR
0.64%	0.38 -1.2

On a pu récupérer une quantité huileuse de 0.64% (tableau 05) cette valeur est acceptable selon les normes AFNOR et comparable aux résultats obtenus par Ayaydia en 2008, qui a enregistré en plusieurs sites les valeurs de rendement de la menthe poivrée suivantes : de Hijra 0.81%, de Beldet Omor 0.45%, et de Awinet Moussa 0.72%.

Généralement les différences dans le rendement doivent être essentiellement dues à la différence de morphologie des plantes (la structure externe des [plantes](#) et de leurs [organes](#)) et l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol).

2.2. Indice de réfraction :

L'indice de réfraction (changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre) d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air à l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Tableau 06: résultat d'Ir:

IR de He étudiée	Norme AFNOR
1.4800	1.4600-1.5000

Notre indice de réfraction mesuré est conforme aux normes. Nos valeurs sont presque similaires à ceux d'Ayaydia Boutheina : Menthe de Hdjira 1.4807, Menthe de Beldet omor ,1.48478 Menthe de Awinet moussa 1.48778.

Généralement l'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers.

Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable. Dans ce cas on peut considérer que notre HE est pur.

2.3. Le pH :

Est une abréviation du terme potentiel hydrogène (H), le pH est un paramètre qui mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺), donc permet de définir si un milieu est acide ou basique.

Dans la mesure du pH de l'huile essentielle de la menthe poivrée on a trouvés la valeur : pH = 6.92, d'où on peut dire que la menthe poivrée étudiée a un pH presque acide. Cette acidité est due à la composition chimique des HEs, qui se considère comme donneur des H⁺.

2.4. La densité:

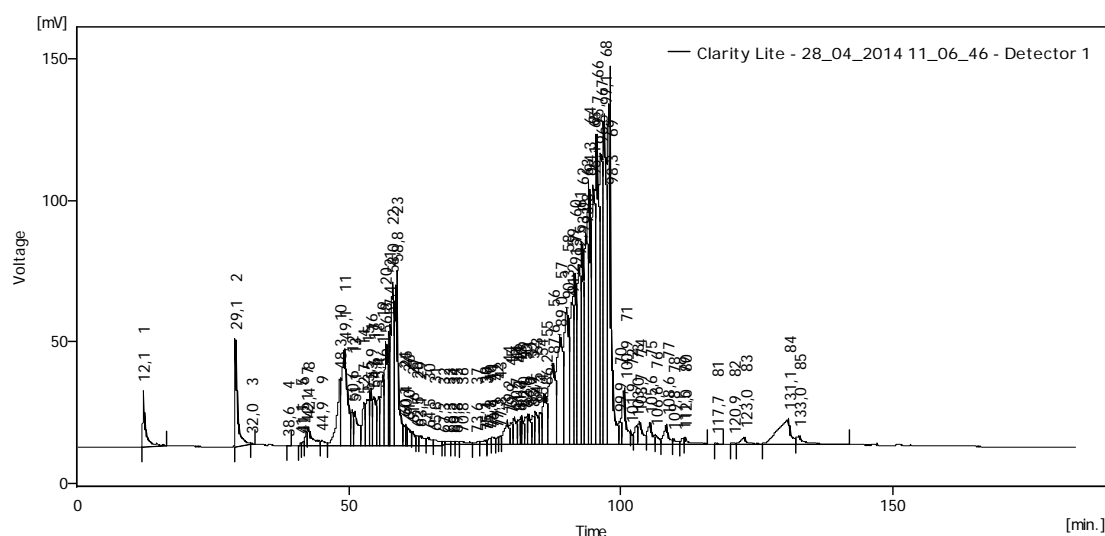
Tableau 07: résultat de la densité

Densité He étudiée	Norme AFNOR
0.8870	0.820-0.9900

On a trouvé une valeur de densité voisine au 0.820-0.9900 (tableau 07), de même les résultats d’Ayaydia Boutheina de menthe de Hijra, menthe de Beldet Omar, menthe de Awinet Moussa a donné des résultats respectivement : 0.8800, 0.8731, 0.9348.les différences dues aux différences des volumes (rendement).

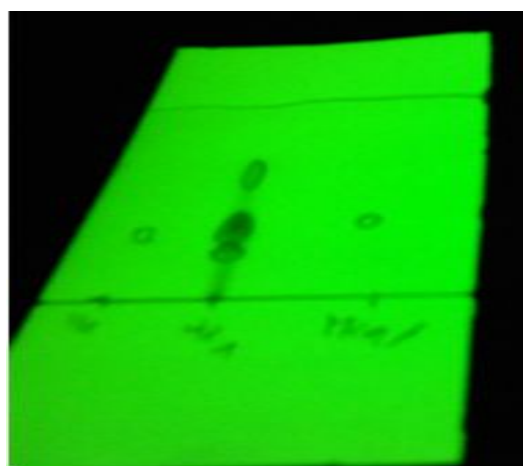
3. analyse chimique par CPG :

Figure 19: graphe représente la CPG de L’He de la menthe poivrée.



L’HE est un mélange de nombreuses molécules chimique, dont chaque composant est représenté par un pic dans le graphe (figure 19). Il ya 85 composants dont certains de forte concentration dans l’HE, et d’autres que des traces. Tandis que La chromatographie sur couche mince indique les principaux composants de l’He étudié.

Figure 20: CCM:



On observe que trois dépôts sont révélés au même niveau horizontal du menthol, on déduit que l'He de la menthe contient du menthol.

Principaux composants biochimiques - Chromatographie phase gaz du lot NHE0316:

Monoterpénols : menthol (38.51%)

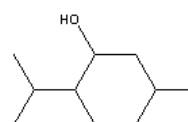
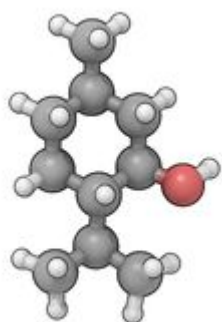
Oxydes : 1,8-cinéole (3.65%), menthofurane (1.16%)

Monoterpénones : menthone (23.01%), pulégone (1.00%)

Esters terpéniques : acétate de menthyle (4.33%)

Les composés les plus majoritaires dans l'He sont: menthol, menthone.

Figure 21: molécules de menthol:



A) Représentation en 3D du menthol

B) formule topologique de menthol

Rouge : oxygène.

Gris : carbone.

Blanc: hydrogène.

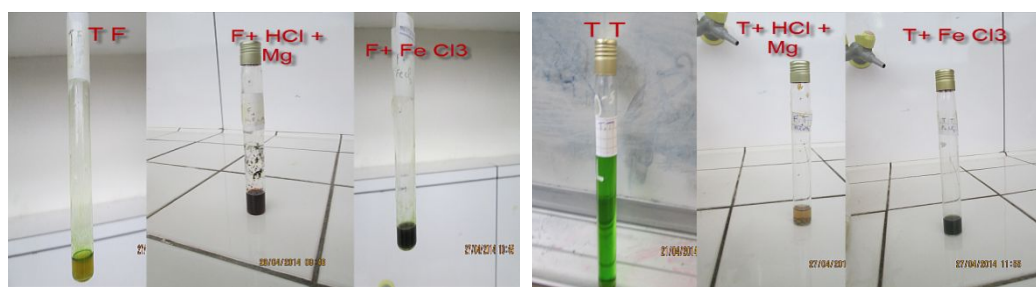
Tableau 08: différence entre menthol et menthone:

	menthol	menthone
formule brute	$C_9H_{18}CHOH$	$C_9H_{18}CO$
formule semi-développée		
couleur	blanc	incolore
masse molaire (g/mol)	156	154

température ébullition °C	215	209
température de fusion °C	43	-6,5

4. Criblage:

Figure 22: résultat de criblage:



Selon la figure 22: on observe un changement de couleur, les résultats sont notés dans le tableau suivant:

Tableau 09: résultats des criblages des tanins et des flavonoïdes

<i>Les extraits</i>	<i>Les réactifs</i>		<i>couleur</i>
<i>extrait méthanolique</i>	<i>HCl + Mg</i> <i>Feuilles</i>	<i>flavonoïdes</i>	<i>rouge brique</i>
<i>extrait méthanolique</i>	<i>FeCl3</i> <i>Feuilles</i>	<i>tanins</i>	<i>brun verdâtre</i>
<i>extrait méthanolique</i>	<i>HCl + Mg</i> <i>Tiges</i>	<i>flavonoïdes</i>	<i>rouge brique</i>
<i>extrait méthanolique</i>	<i>FeCl3</i> <i>Tiges</i>	<i>tanins</i>	<i>brun verdâtre</i>

D après ce tableau on peu dire qu' il ya des flavonoïdes et des tanins qui sont des métabolites secondaires :

Les flavonoïdes responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'[antioxydants](#) dans notre alimentation. Ils forment une sous-classe des [polyphénols](#) .






Les tanins que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux ([écorces](#), [racines](#), feuilles, fruits, etc.) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains [parasites](#). Sur le plan chimique, ils sont constitués soit de [polyol](#) ([glucose](#) le plus souvent), ou de [catéchine](#) ou de [triterpénoïde](#) auquel sont attachés des unités [galloyles](#) (ou leurs dérivés) soit d'[oligomères](#) ou [polymères](#) de [flavanols](#)..

5. activités biologique :

5.1. Activité antifongique :

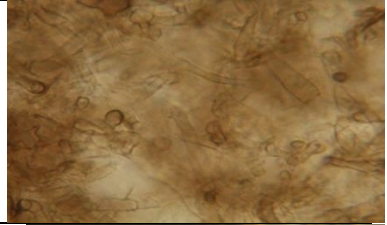
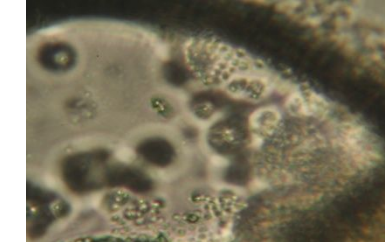
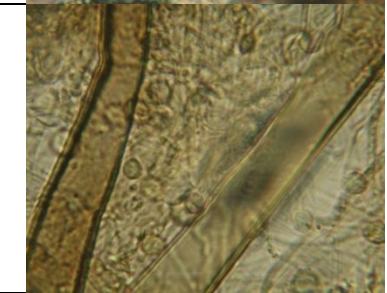

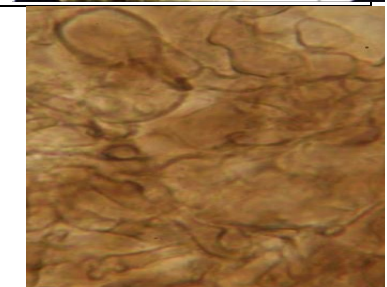
5.1.1. Observation macroscopique

Tableau 10: Caractères macroscopiques des souches:

Code des échantillons	Vitesse de croissance	Couleur de la colonie	Aspect de la colonie	Présence du goutte de transpiration	photos macroscopique
SM1	Moyenne	Marron bordure noire	Granuleuse, concave.	+	
M2	Moyenne	verte	Ovale, Cotonneuse	-	
R-1(1)	Moyenne	noire	Granuleuse, En dôme,	+	
R-1(2)	Moyenne	grise	Ovale, Cotonneuse	+	
R-3(1)	Moyenne	blanche	Plissé, Cotonneuse	+	

5.1.2. Observation microscopique:

Tableau 11: Caractères microscopiques des souches:

Code de l'échantillon	Etude microscopique	Photo microscopique
R ⁻¹ (1)	-Conidiophore septé, noir, lisse, à croissance sympodiale ; -Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement	
SM2	Mycélium cloisonné ; -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.	
SM1	-Thalle à croissance rapide ; -Sporosystophores généralement très grands, terminés en entonnoir, en bouquet de 2à6 présentant à la base de rhizoïdes ; -Columelles brunes, globuleuses ou semi globuleuses	
R ⁻³ (1)	-Mycélium cloisonné ; -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.	
R ⁻¹ (2)	cylindriques ou renflées dans la partie inférieure et terminées par un long col effilé et étroit. Les conidies unicellulaires, lisses ou échinulées, ovoïdes, sont disposées en très longues chaîne basipétales, divergentes ou enchevêtrées.	

5.1.3. Identification des souches:

L'identification a été faite par M^{elle} Abdelaaziz Wided (enseignante dans le département de microbiologie université Constantine 1)

-SM1: *Rhizopus*: est un genre de moisissures communes qui se développent sous forme de filaments dans les sols, Il fait partie de l'ordre des Mucorales. Il produit à la fois des spores sexuées et des spores asexuées.

-SM2 et R⁻³(1): *penicillium* sp2 et *penicillium* sp1 respectivement: Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, Le conidiospore ramifié possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes. Le thalle est vert ou blanc. Ce sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost.

-R⁻¹(1): *Alternaria*: est le nom d'un genre de champignons à reproduction asexuée (Deutéromycètes). Ce genre renferme un grand nombre d'espèces (plus de soixante) parasites ou saprophytes.

-R⁻¹(2):*Paenomyces*.son des champignons imparfait généralement de couleur claire disposée en très longue chaines.

Taux d'inhibition

Figure 23: évolution de l'activité antifongique:

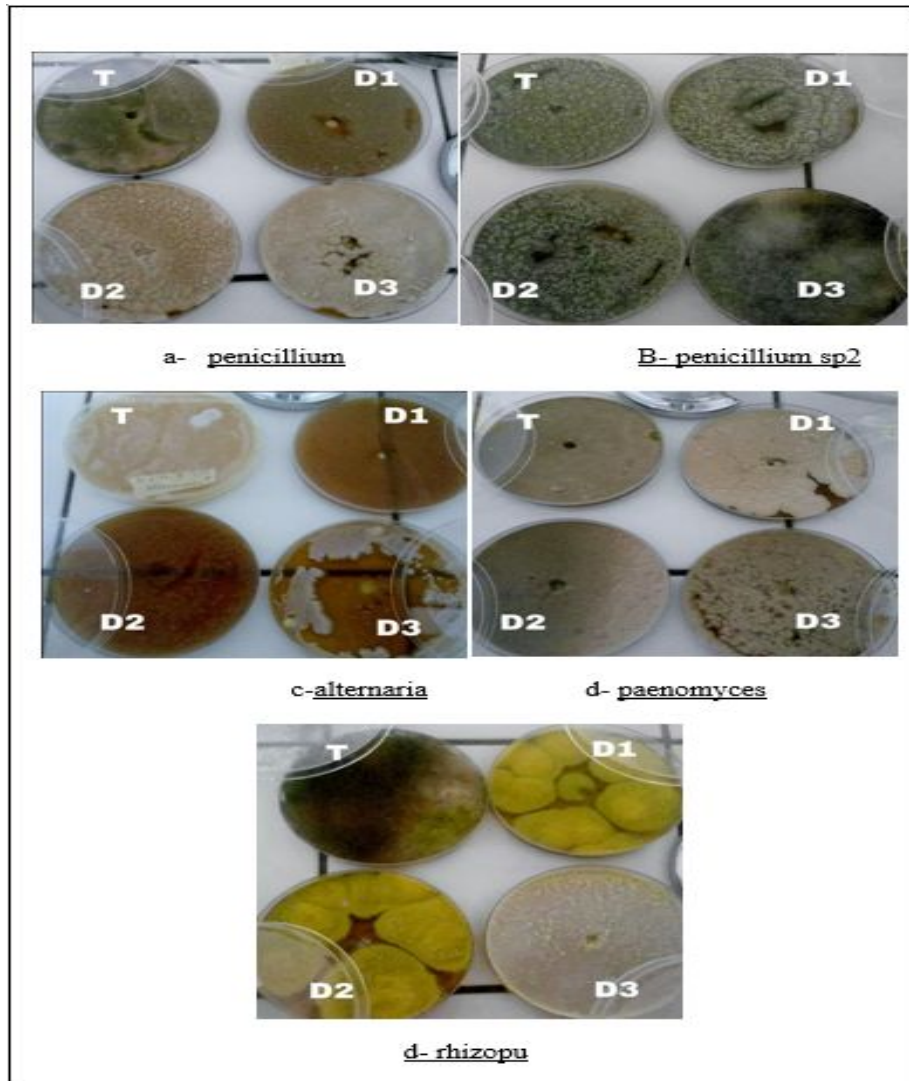


Tableau 12: Diamètres (cm) des zones d'inhibition des huiles essentielle de *Mentha piperita* (+): inhibition totale / (-): absence d'inhibition

souches	doses	7 jours	10 jours	15 jours
<i>Rhizopus</i>	$0 \mu L$	---	---	---
	$3 \mu L$	---	---	---
	$5.5 \mu L$	2 cm	1,7 cm	1,7 cm
	$10.5 \mu L$	+++	+++	+++
<i>Penicillium sp1</i>	$0 \mu L$	---	---	---
	$3 \mu L$	---	---	---
	$5.5 \mu L$	---	---	---
	$10.5 \mu L$	---	---	---
<i>Penicillium sp2</i>	$0 \mu L$	---	---	---
	$3 \mu L$	---	---	---
	$5.5 \mu L$	---	---	---
	$10.5 \mu L$	---	---	---
<i>Paenomyces</i>	$0 \mu L$	---	---	---
	$3 \mu L$	---	---	---
	$5.5 \mu L$	---	---	---

	<u>10.5 μL</u>	---	---	---
<i>Alternaria</i>	<u>0 μL</u>	---	---	---
	<u>3μL</u>	1,45 cm	---	---
	<u>5.5 μL</u>	1,75 cm	---	---
	<u>10.5 μL</u>	+++	+++	+++

Les résultats obtenus avec cette expérience montrent que l'huile essentielle de *Mentha piperita* a un effet différent sur la résistance des champignons.

Le dosage 1 n'a pas un effet sur tout les champignons, par contre la dose 2 inhibe le diamètre de quelque champignons (*rhizopus*, *alternaria*).

La dose 3 a un fort effet sur les 2 genres: *rhizopus* et *alternaria* .mais pour les autres ya aucun effets antifongique.

Le *rhizopus* et *alternaria* ont une sensibilité envers l'HE de la menthe poivrée, mais les autres champignons ne présentent aucune sensibilité.

6. Activité anti-oxydante :

Tableau 13: résultats de l'activité antioxydante

	C1	C2	C3	C4	C5
Vc	0.010	0.027	0.032	0.035	0.041
HE	0.311	0.453	0.506	0.518	0.535

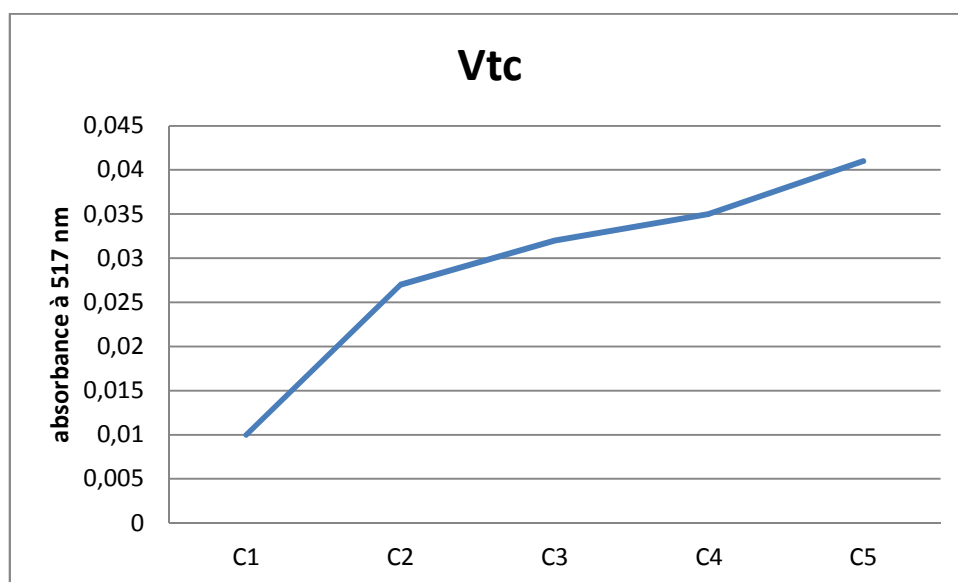
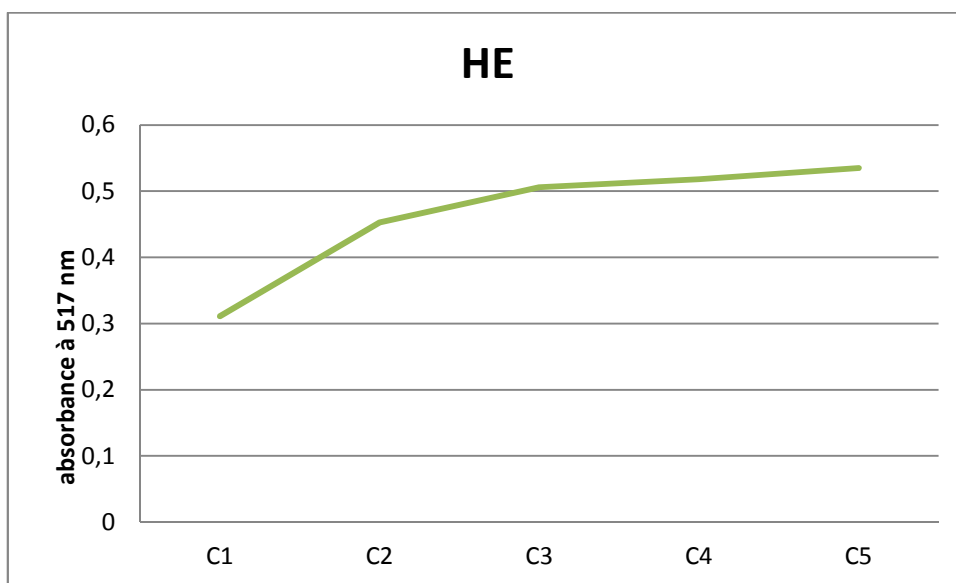


Figure 24: courbes représentent l'évolution de l'activité antioxydante de la Vtc et HE en fonction de l'absorbance:



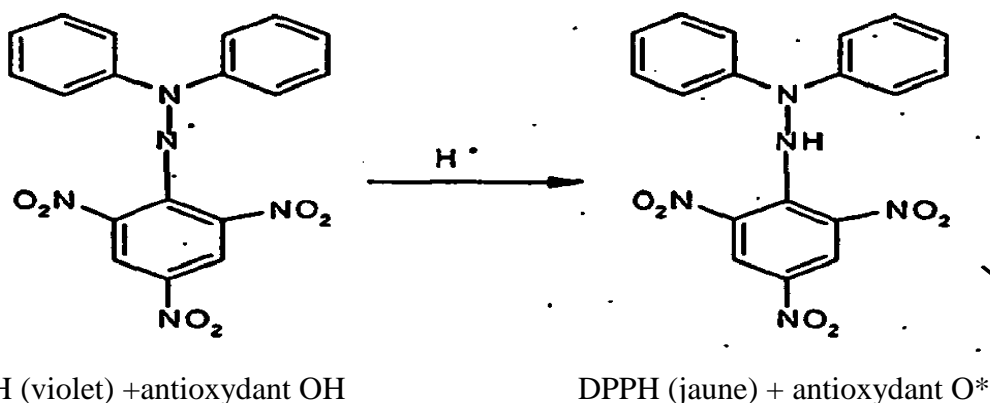
Pour les deux composés examinés (vitamine c et huile essentielle), la réaction est croissante, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (figure 24), alors on distingue deux zones:

- Zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout de C1-C2 pour la vitamine c pour toutes les concentrations et au bout des autres concentrations.
- Zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre constatée après C3 pour toutes les concentrations de la vitamine E, exceptée la concentration 3 l'huile essentielle, cette zone est constatée C5.

Lorsqu'on effectue la réaction entre le DPPH et la vitamine c donneuse d'hydrogène, on constate que la réaction atteint un équilibre au bout d'un temps court par rapport à l'huile essentielle de la menthe poivrée.

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

Figure 25: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH:



Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont enregistrés dans les tableaux suivants:

Tableau 14: résultats de l'activité antioxydante:

concentrations de l'huile essentielles	DO	% d'inhibition
C1	0.311	35.37 %
C2	0.453	17.09 %
C3	0.506	9.06 %
C4	0.518	8.98 %
C5	0.535	8.20 %

Figure 26: Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations D'HE de la menthe:

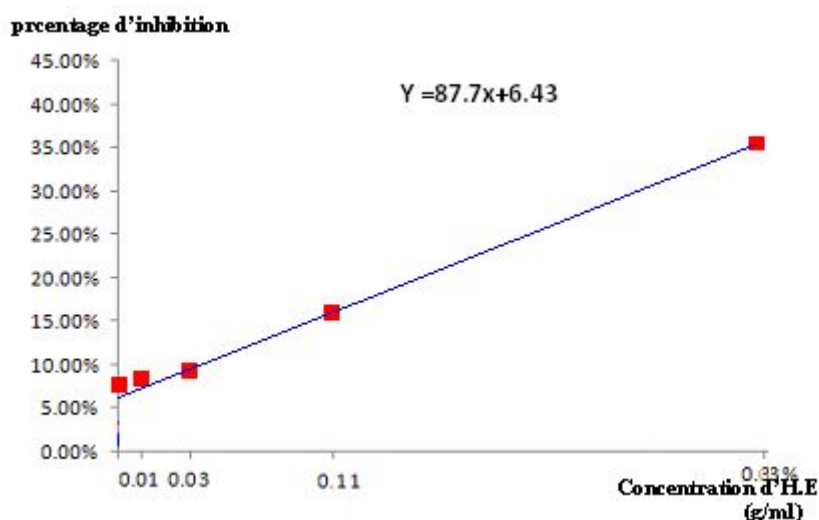
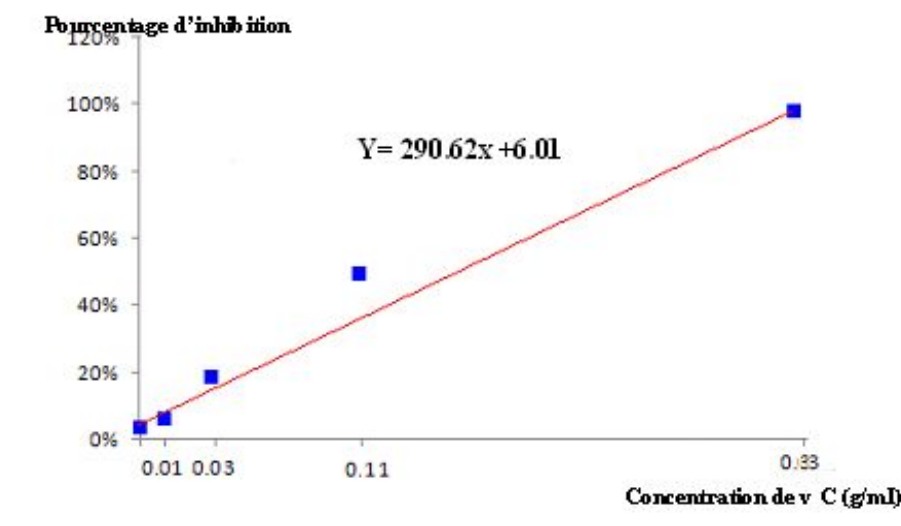


Tableau 15: le pourcentage d'inhibition antioxydante de vitamine C:

concentration de vitamine C	Répétition I (absorbance)	répétition II (absorbance)	répétition III (absorbance)	moyen	pourcentage d'inhibition
C1	0,007	0,004	0,005	0.0053	99%
C2	0,263	0,265	0,256	0.262	55%
C3	0,471	0,483	0,481	0.4.478	18%
C4	0,552	0,547	0,546	0.548	6%
C5	0,579	0,565	0,568	0.571	2%

Figure 27: Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de vitamine C



Détermination d'IC50

IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

La diminution de l'absorbance du radical DPPH est expliquée par sa réduction en présence des extraits des HEs. D'une manière générale, les deux HEs ont provoquées une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 515nm selon les doses étudiées.

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique, une courbe d'étalonnage réalisée par ce dernier a été tracée- Le calcul d'IC50: est la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Tableau 16: résultat du IC50 de HE de *mentha piperita*:

L'extrait	IC50 (mg/ml)
L'HE : <i>Mentha piperita</i>	0.45
Acide ascorbique	0.15

L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant standard utilisé à des fins comparatives. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC50 de l'ordre de 0,15mg/ml.

Malgré que l'activité antioxydante des huiles essentielles testés considère faible devant celle de Vtc, mais elle reste considerable. Ce pouvoir antioxdant due à la richesse en composés phénoliques où Les groupements hydroxyle dans les composés phénoliques peuvent servir comme donneur d'électron. Et des monoterpènes oxygénés et aussi des monoterpènes hydrocarbonés.

7. Dosage des protéines et lipides :

7.1. Dosage des protéines:

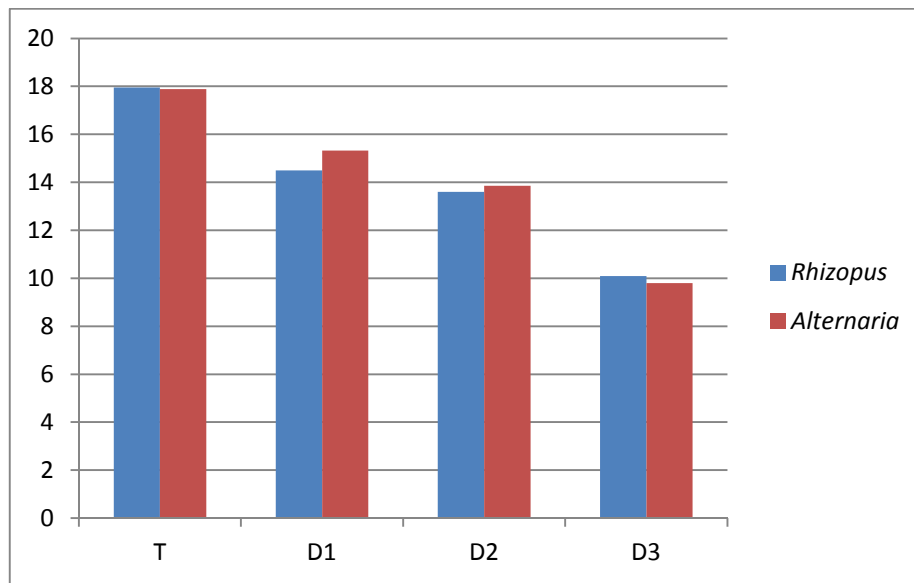
Tableau 17: taux de protéines totals:

Champignons	T	D1	D2	D3
<i>alterneria</i>	0.282	0.224	0.209	0.150
<i>rhizopus</i>	0.296	0.253	0.213	0.145

Le BBC est un pigment existe sous forme cationique, neutre et anionique. Sa longueur d'onde d'absorbance maximale est 465 nm.

Le pigment forme un complexe avec les protéines, sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595 nm. La valeur d'absorbance dépende la concentration de protéine de la solution.

Figure 28: Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations croissantes des champignons:



Les résultats du taux de protéine totale révèle une différence entre le taux de protéines chez souches témoins et souches traités et ca pour les différentes concentrations des HEs.

En effet les taux marquent la valeur 0.282 $\mu\text{g}/\text{mg}$ chez le témoin d'*alternaria* par rapport 0.296 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour le témoin de *rhizopus*.

Pour l'*aternaria* ; 0.150 $\mu\text{g}/\text{mg}$.chez les traités par 10.5 μl , 0.209 $\mu\text{g}/\text{mg}$ chez les traités par 5 μl , 0.224 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour la première dose 3.5 μl .

Alors que pour la souche de *rhizopus* le taux de protéine passe de 0.145 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour les traités par 10 μl de l'HE de la menthe poivrée a 0.213 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 0.253 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour les traités par les doses 5 μl et 3.5 μl respectivement. Ces résultats sont compatibles avec les résultats obtenus au test antifongique.

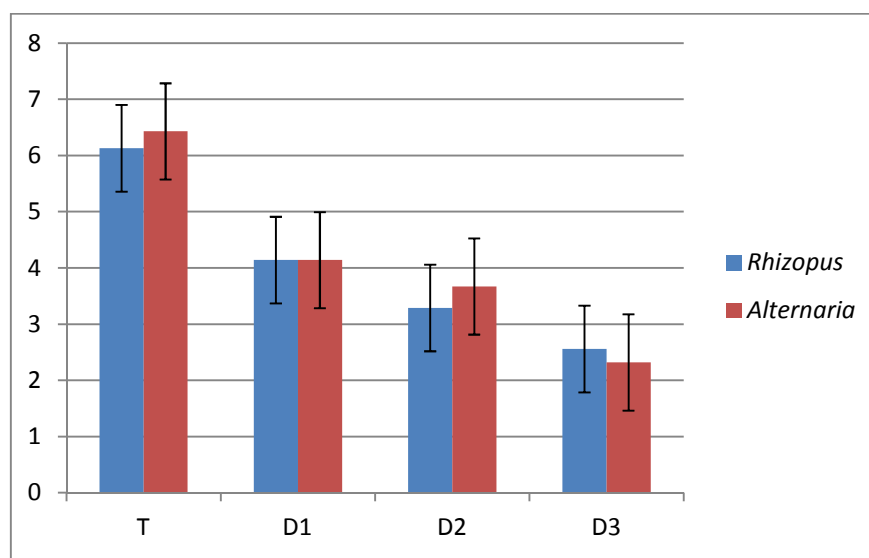
L'influence des doses des HEs de *Mentha piperita* sur les protéines des champignons est très claire, est expliqué par la présence des composés capable de dénaturer et dégrader les protéines. Les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires (protéines) et dégradent la membrane plasmique des champignons (Giordani et Kaloustian, 2006).

7.2. Dosage des lipides:

Tableau 18: dosage des lipide

Champignons	T	D1	D2	D3
alternaria	0.282	0.183	0.149	0.115
Rhizopus	0.296	0.189	0.176	0.104

Figure 29: Evolution du taux de lipides totaux en fonction des concentrations Croissantes des champignons ou D1=3.5 / D2=5 / D3=10.5:



D'après les figures 29, on remarque que le taux des lipides diminue avec une relation dépendante des doses étudiées. Ou le témoin prend les grandes valeurs 0.282 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et 0.296 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'*alternaria* et *rhizopus* respectivement.

Cela s'explique par la dégradation des lipides des deux genres de champignons en presense des huiles esentielles.

Conclusion

L'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique (SVOBODA et SVOBODA, 2000).

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. (BOURGAUD et al, 2001 ; KAR, 2007)

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

Ces HEs ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits :

Elles entrent dans la composition de parfums, de cosmétiques (shampooings, gel-douches, crèmes, laits, déodorants corporels), de produits d'entretien (savons, détergents, lessives, assouplissants de textile) et de tout autre produit, comme par exemple insecticides, désodorisants d'ambiance, diffuseurs, bougies. Elles sont aussi utilisées comme arômes pour ajouter aux aliments des odeurs et/ou des saveurs.

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

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

De ce fait Un autre secteur a vu la lumière ces dernières années c est les biopesticides a base des HES

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

Les effets biologiques bénéfiques des composés volatils (huiles essentielles) est bien étudiés par rapport aux effets toxiques pour cela on a basé dans ce modeste travail sur l'évaluation de la toxicité des huiles essentielles et de mieux comprendre les réponses biologiques induites suite à l'ajout des huiles essentielles a l échèle unicellulaire.

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que la menthe poivrée a un rendement en huile essentielle acceptable et peut être rentable à l'échelle industrielle. Ou on a trouvé une valeur de densité voisine au 0.820-0.9900 (tableau 07), de même les résultats d' Ayaydia Boutheina de menthe de Hijra, menthe de Beldet Omar, menthe de Awinet Moussa ont données les résultats : 0.8800, 0.8731, 0.9348 respectivement.

L'étude chimique des huiles essentielles a montré que la composition chimique de celles-ci diffère qualitativement et quantitativement d'une espèce végétale à une autre, selon les facteurs de variabilité suivants:

- Races chimiques.
- Le cycle végétatif.
- Facteurs de l'environnement.
- Pratiques culturales.

D après le criblage on peu dire qu'il ya des flavonoïdes et des tanins dans notre plante étudiée.

Les resultats du taux de protéine totale révèlent une différence entre le taux de protéines chez souches témoins et souches traités et ca pour les différentes concentrations des HEs. Donc L'influence des doses des HEs de *Mentha piperita* sur

les protéines des champignons est très claire, est expliqué par la présence des composés capable de dénaturer et dégrader les protéines. Les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires (protéines) et dégradent la membrane plasmique des champignons (Giordani et Kaloustian, 2006).

Selon les résultats obtenus après traitements des souches on a remarqué que le taux des lipides diminue avec une relation dépendante des doses étudiées. Ou le témoin prend les grandes valeurs 0.282 µg/mg et 0.296 µg/mg d'*alternaria* et *rhizopus* respectivement.

Cela s'explique par la dégradation des lipides des deux genres de champignons en présence des huiles essentielles.

Le résultat final de cette étude est que L'HE de la menthe poivrée a une influence sur les souches fongiques tirés de l'infusoire surtout l'*alternaria* et *rhizopus* qui ont une forte sensibilité envers l'HE de la menthe poivrée.

Et donc on peut conclure, que les composés de ces huiles présentent plusieurs activités biologiques intéressantes. Cependant, il faut signaler que les activités biologiques d'une huile essentielle ne sont pas seulement dues aux composés majoritaires mais à l'ensemble des composés contenant dans cette huile. C'est pour cela qu'il faut mener une étude détaillée sur les activités biologiques de ces huiles pour montrer leur importance et la possibilité de leur exploitation dans certains domaines : Pharmaceutique, cosmétique, insecticide, alimentaire.

Références bibliographiques

- [1] AFNOR ,2000. Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- [2] AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- [3] Alessandra Moro Buronzo, grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires
- [4] Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal.13, p:235-244.
- [5] Baba-Moussa F., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. J ethnopharmacol; 66 p: 335-338
- [6] Barrata T., Dorman D., Deans S., Figueiredo C., Barroso J. & Ruberto , 1998.
- [7] Bernard et al. 1988 ; Bruneton, 1993
- [8] Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988. Extraction des huiles
- [9] Bien-être, Hachette pratique france, 2008, 205.
- [10] Botanique dansl'antiquité, Tome I, Boulevard Saunt-Germain Paris VIe, 1964, Edition
- [11] Boysen et al., 2000; Hageskal et al., 2006
- [12] Branger et al., 2007
- [13] Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005
- [14] Cahagnier et Richard- Molard, 1998
- [15] calcitran à la réunion, Université Paul_Sabatier de Toulouse, 2008,19-28.
- [16] Castegnaro et Pfohl- Leskowicz, 2002).
- [17] Chaker El Kalamounni, Thèse sur: Caractérisations chimiques et biologiques
- [18] Champion R., 1997 : Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et pratiques, INRA Edition.
- [19] Champion, 1997

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

[21] Département de zoologie agricole et forestière, Institut National Agronomique EI-Harrach Khalfi -Habes ouassi la ' , Boutekedjiret Chahrazed 2 et Se Il ami samira.

[22] Edris, 2007

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

[24] Fahn 1988

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

[26] Guiraud, 1998

[26] Il Edrissi A., Thèse de troisième cycle: Etude des huiles essentielles de quelques Espèces Salvia, Lavandula et Mentha du Maroc, Faculté des Sciences de Rabat, Maroc, 1982,18-22.

[27] Jahandiez E.et Marie R., Catalogues des plantes du Maroc, Spermatophytes et ptérydophytes. Tome III, P. Lechevalier, librairie 12, rue de Tournon VIe, Alger-Paris. 1934,42

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

[29] Kubeczka et al, 1982

[30] Kwon Chung et Bennett, 1992

[31] Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

[32] Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996

[33] Madhavi et al., 1996

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

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

[36] Mohamdi Zohra, Thèse sur : Etude du pouvoir et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Université Abou Baker belkaïd Tlemcen faculté des sciences, 2005-2006,89-92.

[37] Nguyen Minh Tri, 2007

[38] Nicklin et al, 2000

[39] Niessen, 2007

[40] Nisrin Benayad, Thèse sur: les huiles essentielles extraite par plantes médicinales.

[41] Patricia Bechaalany, These sur : Ostéopathie et aromathérapie l'utilisation des Polytechnique de Toulouse, 13 Décembre 2010, 22-38.

[42] Pradeau et Cohen, 1992

[43] ptérydophytes. Tome III, P. Lechevalier, librairie 12, rue de Tournon VIe, Alger-reunion, 13 juillet 2005, 59-71.

[44] Reiss et al, 1998 ; Jin et al. 2004 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Hinrikson et al., 2005 ; Peterson, 2006

[45] Roquebert M.F., 1997.Les moisissures : nature, biologie et contamination. Ed. Université de Lyon. France.

[46] Tranchant J., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson.

[47] Verlet, 1997

[48] Who, 2002

Sites :

[49] <http://menthepoivree.e-monsite.com/pages/ii-composition-de-l-huile-essentielle-de-menthe-poivree.html>.

[50] <https://sites.google.com/site/pastoraldz/plantes-medicinales/plantes-medicinales/plantes-medicinales-en-algerie>.

[51] http://fr.wikipedia.org/wiki/Menthe_poivr%C3%A9e

Annexe A

Selon le type d'huile essentielle, les propriétés peuvent être (non exhaustives) :

- Analgésique (soulage la douleur par une action sédatrice sur les nerfs).
- Antibiotique (lutte contre les infections internes).
- Antidépresseur (lutte contre les états dépressifs).
- Antiémétique (soulage les états nauséux et élimine l'envie de vomir).
- Anti-inflammatoire (réduit les inflammations).
- Antispasmodique (prévient et soigne les douleurs spasmodiques de l'intestin et de l'utérus).
- Antitoxique (agit comme un anti-poison).
- Carminatif (expulse les gaz intestinaux).
- Cicatrisant (accélère et améliore la cicatrisation).
- Déodorant (réduit les odeurs).
- Dépuratif (purifie le sang).
- Digestif (stimule et facilite la digestion. Soulage l'indigestion).
- Expectorant (élimine les excès de mucus présent dans les bronches).
- Fébrifuge (réduit la fièvre).
- Hépatique (stimule et tonifie le foie).
- immunostimulant (renforce les défenses de l'organisme contre les infections).
- Nervin (tonifie le système nerveux).
- Sédatif (réduit le stress et calme le système nerveux).
- Stomachique (stimule la digestion gastrique).
- Styptique (interrompt ou réduit une hémorragie externe).

- Sudorifique (augmente la transpiration).
- Tonique (tonifie le corps ou un organe spécifique).
- Vasoconstricteur (contracte les petits vaisseaux sanguins).

Annexe B

Mode d'action et utilisation des huiles essentielles :

Pour qu'elles entrent en action, les huiles essentielles doivent pénétrer l'organisme (frictions/massages, inhalation, absorption). Ensuite, c'est grâce à la circulation sanguine qu'elles atteignent les foyers à traiter.

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les HE.

Les HE agissent selon leur tropisme; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiqué pour stimuler les personnes Fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu.

Annexe C

Précautions d'usage des HE :

Une huile essentielle est une substance active qui peut être dangereuse si mal employée. Les huiles essentielles sont très riches en principes actifs et extrêmement puissants. Il faut les manipuler avec précaution et les utiliser avec modération. Et pour ce la il faut:

- Respecter scrupuleusement les dosages et modes d'utilisation préconisés qui peuvent être différents selon les voies d'absorption indiquées.

-Ne pas utiliser les huiles essentielles chez les personnes ayant des antécédents épileptiques ou convulsifs, les personnes hypersensibles aux huiles essentielles, les asthmatiques, et les personnes allergiques.

-Ne jamais injecter d'huiles essentielles par voie intraveineuse ou musculaire.

- Allergie : Il est conseillé de pratiquer un test d'allergie avant d'utiliser une huile essentielle.

-Allergies respiratoires, Asthme : L'utilisation des huiles essentielles en diffusion atmosphérique est contre-indiquée.

-Soleil : Eviter toute exposition aux rayons solaires et UV dans les heures qui suivent l'application ou la prise d'une huile essentielle photosensibilisation (Citron, Orange, Mandarine, Bergamote, Khella).

-Absorption accidentelle : Faire ingérer (et, si possible, faire vomir) de l'huile végétale pure (1 à 3 cuillers à soupe, olive, tournesol etc.). Ne jamais faire boire de l'eau! Les huiles essentielles ne sont pas hydrosolubles.

Les huiles essentielles sont à éviter pour les femmes enceintes, les personnes âgées ou fragiles et les enfants de moins de 3 ans.

-N'appliquez jamais d'huiles essentielles sur les muqueuses ou autour des yeux.

-Les huiles essentielles s'emploient en général très diluées sur la peau pure, elles risqueraient d'être dangereuses. Les huiles essentielles sont solubles dans l'huile ou l'alcool, mais elles ne sont pas hydrosolubles (ne se dissolvent pas dans l'eau).

-Les huiles essentielles contenant des phénols sont hépatotoxiques (origan, sarriette, thym à thymol...).

-À savoir aussi, les chats (Ou autres animaux) ne supportent pas les HE, qui peuvent s'avérer mortels pour eux.

Annexe D

- Sabouraud gélosé

Peptone.....40g
Agar.....20g
Eau distillée.....1000ml

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn.

- Sabouraud liquide

Néopeptone.....10g
Glucose.....20g
pH=5-5.6

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn

Annexe E

Tableau : Estimation de la production mondiale des huiles essentielles les plus représentatives (en milliers de dollars).

Espèces	Valeurs (en milliers de dollars)
Menthe poivrée	96000
Menthe arvensis	57600
Menthe crépue	40000
Citron	33000
Orange	30000
Litsea cubeba 16 000	16000
Eucalyptus 15 550	15550
Jasmin 15 000	15000
Santal 14 000	14000
Citronnelle 13 110	13110
Vétiver 13 000	13000
Patchouli 12 270	12270
Lavandin 11 400	11400
Cèdre	11000
Lime	10540
Bergamote	10350
Geranium	10000

RESUME :

Notre travail se base principalement sur une étude d'huiles essentielles de menthe de la région de Tidis Constantine.

La menthe poivrée, largement répandue en Algérie, de la famille des Lamiaceae est une plante herbacée indigène de plusieurs propriétés thérapeutique (antiseptique, antinévralgique, analgésique...).

L'extraction de sa fraction aromatique offre de nouvelles perspectives en aromathérapie.

L'extraction des huiles essentielles de la menthe, accomplie par Hydrodistillation juste après la floraison, a donné un rendement de 0,81 % acceptable et peut être rentable à l'échelle industrielle.

Les résultats des analyses physiques de l'huile essentielle sont en accord avec ceux des normes AFNOR.la CPG qui indique un nombre de composants.

Ainsi, l'évaluation de l'activité antioxydante et antifongique des huiles essentielles de la menthe poivrée

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH• a montré l'existence d'une activité antioxydante de l'huile essentielle de la menthe .La détermination de l'activité antifongique sont favorables pour le développement des moisissures. La purification et l'étude microscopique des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier 5 genres de moisissures à savoir : pinicylomyces Penicillium,Rhizopus et Alternaria. L'étude de la contamination montre une dominance des genres Penicillium et Aspergillus

L'évaluation de l'activité antifongique a révélé l'inhibition de croissance des moisissures pour la plupart des souches testées. Les souches tests et les différents champignons n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis de l'HE.

Le criblage (screening), montre la présence des flavonoïdes et les tanins dans les parties aériennes (tiges, feuilles) de la menthe poivrée.

Mots-clés : Menthe poivrée, Huile essentielle, Activité biologique, Activité antioxydante ; Activité antifongique, criblage.

يسند عملنا على دراسة متعلقة بالزيت الاساسي للنعناع الفلفلي المأخوذ من منطقة تيديس بقسنطينة . يعتبر النعناع الفلفلي من النباتات العشبية المنتشرة في الجزائر من العائلة الشفوية . معروفة بفعالية ضد البكتيريا و الفطريات.

استخرج الزيت الاساسي باستعمال التبخر المائي. وقد تحصلنا على مردود % 0.64 ويعتبر مردود مقبول على المستوى الصناعي.

التحليل الفيزيوكيميائية المجراة على الزيوت الطيارة كانت ذات نتائج موافقة مع الاعمال السابقة للنعناع الفلفلي. و AFNOR التي بينت وجود عدة مركبات بنسب مختلفة.

كذلك الفعالية ضد الفطريات خاصة *Alternaria* ، *Rhizopus* التي اظهرت حساسية للزيت وهذه الاخيرة تختلف من فطر الى اخر. إضافة للفعالية ضد الاكسدة بإرجاع H^+ وذلك لوجود الفلافونويدات و التانينات كما بينتها نتائج Criblage

كما يوجد هناك تأثير الزيوت الطيارة على البروتينات و الليبيدات .

كلمات الرئيسية : النعناع الفلفلي , النشاط البيولوجي , والنشاط المضادة للأكسدة , نشاط مضاد للفطريات

Abstract :

Our work is based mainly on a study of essential oils of mint grown in the region of Commons. Mint, widespread in Algeria, of the family Lamiaceae is an herb native to several therapeutic properties (antiseptic, anti-neuralgic, analgesic ...).

The extraction of the aromatic fraction offers new perspectives in aromatherapy. The extraction of essential oils from three varieties of mint, accomplished by hydrodistillation just after flowering, gave a yield of 0.64% acceptable And may be cost effective on an industrial scale. The results of physico- chemical analysis of the essential oil are in agreement with those of AFNOR standards.

The study of antioxidant capacity by the DPPH • method showed the existence of antioxidant activity of the essential oil of peppermint. Purification and microscopic study of isolated strains were given an opportunity to identify five types of mold are: 2 kinds of Penicillium, paenomyces, Rhizopus and Alternaria. The evaluation of the antifungal activity showed inhibition of mold growth for most strains tested. The test strains isolated and different kinds do not have a similar sensitivity to the screw - He.

The studies of lipid and protein assay indicates that He comes

Keywords: Peppermint essential oil, biological activity, antioxidant activity; Antifungal activity, screening.

