

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI - CONSTANTINE 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et écologie végétale



N° d'ordre :43/Ds/2019

N° de série :04/EV/2019

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en sciences

Filière: Biotechnologie végétale

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

**Etude de la micropropagation de *Mentha x rotundifolia* (L.)Huds et
Mentha pulegium L.:
Production des huiles essentielles et évaluation des activités biologiques**

Mme. BENAHMED Amira ep.MESKALDJI

Devant le jury :

Président :

KHELIFI DOUADI

Prof Université Des Frères Mentouri. Constantine 1

Encadreur:

BELKHIRI ABDELMALIK

Prof Université Salah Boubnider. Constantine 3

Examineurs :

AKKAL SALAH

Prof Université Des Frères Mentouri. Constantine 1

ZELLAGUI AMAR

Prof Université Larbi Ben M'hidi. OumEl Bouagui

HARFI BOUALEM

MRA Centre de Recherche en Biotechnologie.Constantine

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, Monsieur BELKHIRI Abdelmalik, Professeur à la faculté de médecine (Constantine), qui a encadré ce travail avec beaucoup d'intérêt et d'optimisme. Un grand merci pour ses précieux conseils, ses remarques pertinentes et ses suggestions, pour tout ce qu'il m'a appris scientifiquement et surtout pour la confiance qu'il m'a accordé.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur KHELIFI Douadi, Professeur à l'université des frères Mentouri. Constantine 1, pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse. Qu'il trouve là mes profonds respects.

A Messieurs les Professeurs AKKAL Salah et ZELLAGUI Amar, qu'ils reçoivent toute ma gratitude pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur HARFI Boualem, Maître de recherche A, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt). Constantine, pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je tiens également à le remercier pour son aide, sa gentillesse et son soutien dans toutes les étapes de réalisation de cette thèse.

Je suis essentiellement reconnaissante à tous le personnel du laboratoire culture *in vitro* végétale, Centre de Recherche en Biotechnologie(C.R.Bt), Constantine, pour le climat sympathique et familiale dans lequel le travail a été réalisé. Particulièrement, je tiens à remercier Madame BENBELKACEM Ibtissem, Madame BENCHIKHELHOCINE Imen, Madame CHEROUANA Khaoula, et Madame DAAS Abla.

Je voudrai exprimer tout mes remerciements au personnel du laboratoire microbiologie, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Constantine, particulièrement à Madame IKHLEF Assia et Mademoiselle MEGHEZZI Asma pour leur précieuse aide.

Mes remerciements les plus profonds vont aussi au personnel du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC).

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans mes travaux de recherches.

BENAHMED Amira

Dédicaces

A celui qui m'a indiqué la bonne voie...à mon père, que dieu le protège. J'espère que je serai toujours à la hauteur de ses espérances. Cette thèse est l'aboutissement de ces efforts.

A celle qui m'a attendu avec amour les fruits de sa patience. Que dieu me la protège.....à ma mère, qui m'a soutenue et entouré avec beaucoup d'affection.

A celui qui m'a toujours encouragé....à mon mari Abdelmoutalib, qui était toujours à mes côtés.

A mes deux anges Medjdouline et Djad, que Dieu me les garde.

A mes frères Fares, Seifeddine et Mohamed lamine.

A ma chère sœur Nawel.

A tous ceux qui m'ont aidé et encouragé.

AMIRA

Liste des Abréviations

HE	Huiles essentielles
M.	<i>Mentha</i>
HD	Hydrodistillation
EV	Evaporation
Tween 20	Monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane
Na₂SO₄	Sulfate de sodium anhydre
MS	Milieu de culture Murashige et Skoog (1962)
BAP	6-Benzylaminopurine
GA3	Gibbérelline
MV	Matière végétale sèche
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
SM	spectrométrie de masse
IR	Indice de rétention
mL	Mililitre
nm	Nanomètre
g	gramme
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux
A_{0,5}	Absorbance relative à 50% de la capacité antioxydante
BHA	Antioxydant de synthèse Hydroxyanisole butylé
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
ATCC	American Type Culture Collection

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Bibliographie des huiles essentielles de <i>M. pulegium</i> dans le monde.	7
Tableau 2: Bibliographie des huiles essentielles de <i>M. rotundifolia</i> dans le monde.	12
Tableau 3: Additifs alimentaires provenant de cultures de cellulaires végétales	29
Tableau 4: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées	40
Tableau 5: Effet de combinaisons d'hormones (BAP, GA3) sur l'induction de pousses.....	44
Tableau 6: Effet de la BAP et la GA3 sur la multiplication de <i>vitro plant</i>	46
Tableau 7: Rendement en HE de la plante-mère et des <i>vitro plants</i>	51
Tableau 8 : Composition chimique des HEs de la plante-mère et les <i>vitro plants</i> de <i>M. rotundifolia</i> . .	54
Tableau 9 : Composition chimique des HEs de la plante- mère et les <i>vitro plants</i> de <i>M. pulegium</i>	59
Tableau 10: Activité antimicrobienne des HE des plantes-mères sur les souches microbiennes.....	63
Tableau 11: Echelle de mesure de l'activité antimicrobienne.....	64
Tableau 12: Activité antimicrobienne des HE des cultures stressées de <i>M. rotundifolia</i>	67
Tableau 13: Activité antimicrobienne des HE des cultures stressées de <i>M. pulegium</i>	71
Tableau 14: Activité antioxydante des HE <i>vis à vis</i> du radical DPPH, ABTS et CUPRAC.	77

Liste des Figures

Figure 1: <i>Mentha pulegium</i> L.....	6
Figure 2 : <i>Mentha x rotundifolia</i> (L.)Huds.....	11
Figure 3 : Structures histologiques des plantes	15
Figure 4 : Molécule d'isoprène	16
Figure 5 : voies de biosynthèse des monoterpènes dans la menthe poivrée.....	17
Figure 6: <i>Mentha rotundifolia</i> (à gauche), <i>Mentha pulegium</i> (à droite).....	32
Figure 7: Schéma de piégeage du radical libre DPPH	37
Figure 8: protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS+.	38
Figure 9 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits au CUPRAC	39
Figure 10: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes.	40
Figure 11: <i>Vitro plants</i> enracinés.	47
Figure 12: Les étapes de l'acclimatation des <i>vitro plants</i> de <i>M. rotundifolia</i>	49
Figure 13: Les étapes de l'acclimatation des <i>vitro plants</i> de <i>M. pulegium</i>	50
Figure 14 : Tracé chromatographique de l'HE de <i>M. rotundifolia</i> (plante-mère).	53
Figure 15: Teneur en % de l'oxyde de piperitenone dans les HE accumulé dans les cultures et la plante-mère de <i>M. rotundifolia</i>	55
Figure 16: Voie de conversion des unités isoprénoïdes C5 via le géranyl diphosphate et le limonène en principaux composants de l'HE	57
Figure 17 : Tracé chromatographique de l'HE de <i>M. pulegium</i> (plante-mère).	58
Figure 18: Teneur en % des constituants majoritaires dans les HE accumulé dans les cultures et la plante-mère de <i>M. pulegium</i>	61
Figure 19: Biosynthèse du (-) - menthol et des monoterpénoïdes apparentés chez <i>Mentha</i>	62
Figure 20: Zones d'inhibitions des HE de <i>M. rotundifolia</i> et <i>M. pulegium</i>	66
Figure 21: Classification K-Médoid des HE des cultures de <i>M. rotundifolia</i>	69
Figure 22: Zones d'inhibition des HE des cultures <i>M. rotundifolia</i>	70

Figure 23: Classification K-Médoid des HE des cultures de <i>M. pulegium</i>	73
Figure 24: Zones d'inhibition des cultures de <i>M. pulegium</i>	74
Figure 25: IC ₅₀ des HE des cultures de <i>M. rotundifolia</i> pour le test DPPH.	79
Figure 26: IC ₅₀ des HE des cultures de <i>M. pulegium</i> pour le test DPPH.	79
Figure 27: IC ₅₀ des HE des cultures de <i>M. rotundifolia</i> pour le test ABTS.	82
Figure 28: IC ₅₀ des HE cultures de <i>M. pulegium</i> pour le test ABTS.	82
Figure 29: A _{0,5} des HE des cultures de <i>M. rotundifolia</i> pour le test CUPRAC.	85
Figure 30: A _{0,5} des HE des cultures de <i>M. pulegium</i> pour le test CUPRAC.	85

Sommaire

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Liste des Abréviations	iii
Liste des Tableaux	iv
Liste des Figures	v

INTRODUCTION	2
---------------------------	---

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Description botanique des espèces étudiées	5
1.1 <i>Mentha pulegium</i>	6
1.1.1 Taxonomie et description	6
1.2.2 Travaux ultérieurs sur la composition chimique	7
1.2.3 Utilisation	9
1.2 <i>Mentha rotundifolia</i>	10
1.2.1 Taxonomie et description	10
1.2.2 Travaux ultérieurs sur la composition chimique	11
1.2.3 Utilisation	12
2. Huiles essentielles	13
2.1 Localisation des huiles essentielles	14
2.2 Composition chimique des huiles essentielles	15
2.3 Biosynthèse des monoterpènes chez les menthes.....	17
2.4 Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	18
2.4.1 La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	20
2.4.2 Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	20
2.5 Activités biologiques et utilisations des huiles essentielles.....	21
2.6 Importance économique des huiles essentielles de menthes	22
2.7 Marché des huiles essentielles en Algérie	24

3. Régénération par les techniques de culture <i>in vitro</i>	24
3.1 Généralités.....	24
3.1.1 Milieux de culture de base.....	26
3.1.2 Substances de croissance.....	26
3.1.3 Conditions d'incubation	26
3.2 Micropropagation des espèces de Menthe.....	27
3.3 Production des métabolites par culture <i>in vitro</i>	28
3.3.1 Huiles essentielles des plantes micropropagées	30

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal.....	32
1.1 Collecte et identification des espèces :.....	32
2. Micropropagation	32
2.1. Désinfection du matériel végétale de départ	32
2.2. Etablissement des cultures <i>in vitro</i>	33
2.3. Multiplication des cultures	33
3. Acclimatation des <i>vitro plants</i>	33
3.1 Etude de l'effet des conditions de stress dans la chambre d'acclimatation.....	34
4. Extraction et analyse des HE.....	34
4.1 Extraction des HE.....	34
4.2 Rendement de l'extraction.....	35
4.3 Analyse quantitative des huiles essentielles par CPG/MS	35
5. Activités biologiques des HE	36
5.1 Activité antioxydante des HE.....	36
5.1.1 Test au DDPH	36
5.1.2 Test à l'ABTS.....	37
5.1.3 Test au CUPRAC:	38
5.2 Activité antimicrobienne des HE	39
5.2.1 Principe.....	39
5.2.2 Souches microbiennes	40
5.2.3 Protocole expérimental.....	40
6. Analyse statistique.....	42

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Micropropagation <i>in vitro</i>	44
1.1 Obtention des <i>vitro plants</i>	44
1.2 Multiplication des pousses	45
1.3 Enracinement des <i>vitro plants</i>	46
1.4 Développement des <i>vitro plants</i>	47
2. Acclimatation des <i>vitro plants</i>	48
3. Effet des conditions d'acclimatation sur le rendement en HE.....	51
4. Effet des conditions d'acclimatation sur le profil chromatographique des HE.....	52
4.1 Observations faites sur <i>Mentha rotundifolia</i>	52
4.2 Observations faites sur <i>Mentha pulegium</i>	57
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE	63
5.1 Observations faites sur les plantes-mères.....	63
5.2 Effet des conditions de culture sur l'activité antimicrobienne des HE.....	67
5.2.1 Observations faites sur les cultures de <i>Mentha rotundifolia</i> :	67
5.2.2 Observations faites sur les cultures de <i>Mentha pulegium</i> :	71
6. Evaluation de l'activité antioxydante des HE	76
Conclusion générale	88

Références bibliographiques

Annexes

Publication

Résumés

Introduction

L'industrie alimentaire utilise dans la formulation des produits alimentaires des additifs dans un but technologique (y compris organoleptique), dont on distingue les conservateurs. Ces derniers sont définis par l'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (**FAO, 2018**) de toute substance chimique naturelle ou synthétique ajoutée aux aliments afin de prolonger leur durée de conservation en les protégeant des altérations dues aux microorganismes et d'empêcher toutes modifications de leur goût ou aspect.

Selon le règlement européen n°1333/2008 relatif aux additifs alimentaires, les additifs "conservateurs" sont définis comme "des substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux microorganismes et/ou qui les protègent contre la croissance de microorganismes pathogènes."

L'utilisation excessive des conservateurs chimiques de synthèse, dont beaucoup sont suspects en raison de leurs actions cancérigènes ou toxicité résiduelle, a eu comme conséquence une pression croissante sur les acteurs de l'industrie agroalimentaire quant à la substitution des conservateurs de synthèse par leur analogue d'origine naturelle.

C'est dans ce contexte que notre étude a été orientée vers la recherche de conservateurs naturelles de substitution, possédant des activités antimicrobiennes et antioxydantes afin de les appliquer en tant que bio-conservateurs.

Les espèces de la famille des Lamiacées sont des espèces médicinales et aromatiques qui englobent un certain nombre de plantes à valeur économique (ex. Menthe poivrée, sauge, lavande, etc.), utilisées comme épices, aromates, conservateurs et pour leur intérêt médicinal et culinaire. En Algérie, le genre *Mentha* est représenté par 6 espèces : *Mentha rotundifolia* (L.) Huds, *Mentha longifolia* (L.) Huds, *Mentha spicata* L., *Mentha aquatica* L., *Mentha pulegium* L. et *Mentha piperita* L. (**Quezel et Santa, 1963**).

Certaines de ces espèces, et c'est le cas de *M. rotundifolia* et *M. pulegium* présentent peu d'applications dans les domaines de la pharmacie, agroalimentaire et cosmétique. Ces espèces sont connues pour produire des HE (**Benayad, 2008**). Les raisons du peu d'intérêt de la part des industriels envers ces plantes et leurs HE résident essentiellement sur le peu de connaissance qu'on a sur ces substances végétales et leurs préparations (HE, extraits, etc.), sur le volet scientifique notamment leurs propriétés biologique, pharmacologique et leur innocuité. Un autre paramètre important et critique dans le développement industriel d'un produit réside dans l'assurance de l'approvisionnement à partir de matière première de qualité reproductible (**Wchtl et Anton, 2003**).

La culture *in vitro* de cellules végétales est considérée comme un moyen alternatif de production de substances végétales utiles pour contourner les problèmes liés à l'approvisionnement en matières premières à partir des sources conventionnelles tels que :

climats, saisons, disponibilité en eau, maladies, ravageurs et à la rareté des plantes à croissance spontanée. De telles limites ont conduit à l'utilisation de techniques de culture *in vitro* pour la production de ses composés bioactifs.

Dans le cas de la normalisation des matière première végétale, les techniques de micropropagation offrent un outil précieux pour évaluer les paramètres biotiques et abiotiques et leur impact sur la teneur en substances d'intérêt (**Rao et ravishankar, 2002 ;Verpoorte et al., 2002**).

Cette étude a été initié sur *Mentha×rotundifolia* et *Mentha pulegium* avec comme double objectif :

- Déterminer les compositions hormonales pour la micropropagation de *in vitro plants* des deux espèces ;
- Evaluer l'effet les conditions de culture (température, photopériode) sur le rendement, la composition des HE et leurs impacts sur les activités antioxydantes (DPPH, ABTS, CUPRAC), et antimicrobiennes testées sur 5 souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans*).

Le présent manuscrit est présenté en trois parties :

- La première partie traite des données bibliographique sur les aspects botaniques des plantes étudiées et travaux ultérieurs, sur les HE, leurs analyses chimiques et propriétés biologiques ainsi que sur la technique de micropropagation.
- La seconde partie comprend une description du matériel et méthodes utilisés.
- La troisième partie contient les résultats et leurs discussions.

La conclusion générale et les annexes sont placées en fin de manuscrit.

Partie I : Revue bibliographique

1. Description botanique des espèces étudiées

Les menthes font parties de la famille des Labiées (*Lamiaceae*) qui forment, avec près de 3500 espèces et 8 sous-familles (*Ajugoideae*, *Chloranthoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Pogostemonoideae*, *Scutellarioideae*, *Teucroideae* et *Viticoideae*), une vaste et importante famille très typique du monde végétal. Près de la moitié (47%) des *Lamiaceae* sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae*. Cette famille regroupe des plantes herbacées, répandues dans le monde entier, mais particulièrement présentes dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. Elles sont pour la plupart aromatiques (basilic, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, serpolet, thym,...), partiellement ligneuses et forment des arbustes et très rarement des arbres. Leurs caractéristiques communes sont les suivantes : les fleurs sont hermaphrodites, le calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et présente souvent deux lèvres.

Au sein de la sous-famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate. La menthe est une plante herbacée vivace, dicotylédone et gamétopétale, susceptible de se reproduire par des rhizomes, par marcottage ou par bouturage.

Elle apprécie les situations fraîches, moyennement éclairées, des sols riches en éléments nutritifs, affectionnant un pH plutôt neutre (**Bruneton, 1995**). Il existe de très nombreuses espèces dont certaines, telles *M. pulegium* et *M. rotundifolia*, poussent spontanément en Algérie (**Brada et al., 2007**). La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents.

Autant les Menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie (**Benayad, 2008**)

Parmi toutes les labiées, les Menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales.

Alors les principales caractéristiques de ces espèces sont :

- une tige quadrangulaire.
- des feuilles simples et opposées.

- l'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché.

1.1 *Mentha pulegium*

1.1.1 Taxonomie et description

Classification Selon Cronquist (1981)	Classification APG III
Règne : Plantae	Clade : Spermatophyta
Division : Magnoliophyta	Clade : Angiospermes
Classe : Magnoliopsida	Clade : Dicotylédones vraies
Ordre : Lamiales	Clade : Asteridées
Famille : Lamiaceae	Clade : Euastéridées I
Genre : <i>Mentha</i>	Ordre : Lamiales
Espèce : <i>Mentha pulegium</i> L.	Famille : Lamiaceae
	Genre : <i>Mentha</i>
	Espèce : <i>pulegium</i>
	Nom Latin : <i>Mentha pulegium</i> L.
	Nom Français : Menthe pouliot ,Pouliot, Pouliot royal, Herbes aux puces



(a)

Figure 1: *Mentha pulegium* L.

https://fr.wikipedia.org/wiki/Menthe_pouliot#/media/File:Mentha_pulegium.jpg.2018

M. pulegium, très répandue dans l'aire méditerranéenne, est connue sous le nom de « menthe pouliot ». Elle est fréquente dans les milieux humides et elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces.

Malgré son utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, son intérêt économique demeure limité (Sutour, 2010).

Les feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Les fleurs, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches échelonnées le long de la tige. C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte).

1.2.2 Travaux ultérieurs sur la composition chimique

L'huile essentielle obtenue de la menthe pouliot représente trois chémotypes différents (Arvy *et al.*, 2003) :

- chémotype 1 : huiles riches en pulégone, menthone et isomenthone
- chémotype 2 : huiles riches en pipériténone, ou pipéritone, avec de la pulégone, menthone et isomenthone
- chémotype 3 : huiles riches en isomenthones, néoisomenthone avec de la pulégone et de la menthone.

Le Tableau 1 recense tous les travaux réalisés sur la composition chimique des HE de *M. pulegium* dans le monde, en plus des localités, des composés majoritaires et leur mode d'extraction.

Tableau 1 : Bibliographie des huiles essentielles de *M. pulegium* dans le monde.

Pays	Références	Méthodes	% Composés majoritaires
Algérie	Beghidja <i>et al.</i> , 2007	EV	Pulégone (43,3-87,3%)
		HD	Pulégone (87,3%)
	Lahrech <i>et al.</i> , 2010	HD	Pulégone (70-90%)
	Boukhebt <i>et al.</i> , 2011	HD	Pulégone (38,8%), menthone (19,2%), Pipériténone (16,5%)
	Ouakouak <i>et al.</i> , 2015	HD	Pulégone (46,31%), Pipériténone (23,3%), menthone (6,2%), limonène (4,7%)
Maroc	Bouchra <i>et al.</i> , 2003	HD	Pulégone (80,3%)
	Derwich <i>et al.</i> , 2010	HD	Pulégone (6,45%), pipéritone (35,56%), pipériteronone (21,18%), α -terpineol (10,89%)

	Ait-Ouazzou <i>et al.</i> , 2012	EV	Pulégone (70%)
	Benayad <i>et al.</i> , 2012	HD	Pulégone (73,33%), menthone (8,63%)
	Zekri <i>et al.</i> , 2013	HD	Pulégone (68,86- 81,46%), pipéritenone (24,79% -26,04%)
	Cherrat <i>et al.</i> , 2014	EV	Pulégone (33,65%), α -terpinenylacetate (24,29%)
	Zantar <i>et al.</i> , 2015	EV	Pulégone (80%), limonène (1,3-1,5%), menthone (1,3-2,3%), pipéritone (6,5-8,16%)
Grèce	Sivropoulou <i>et al.</i> , 1995	HD	Pulégone (44,7%)
	Cook <i>et al.</i> , 2000	HD	Pipériténone(32,8-75,8%/5,1-35,0%)
	Kokkini <i>et al.</i> , 2002	HD	Pipériténone (83,7-97,2%)
	Kokkini <i>et al.</i> , 2004	HD	Isomenthone (32,8-75,8%/ 4,3-28,6%)
	Cook <i>et al.</i> , 2007	HD	Pulégone (32,8 %, - 75.8 %), pipéritenone (5,1 % -35 %,), isomenthone (4,3 %– 28,6 %,), pipéritone (0,5 % -5,2%)
	Petrakis <i>et al.</i> , 2009	HD	Pulégone (>50%)
Portugal	Costa and J. Fernandes, 1952	HD	Pulégone (83%)
	Teixeira <i>et al.</i> , 2012	HD	Menthone (35,9%), Pulégone (23.2%), Neoisomenthol (9.2%)
	Rodrigues <i>et al.</i> , 2013	HD	Pulégone (52-82%), isomenthone (2-36), menthone (0,1-17%), Pipériténone (1-15%)
Turquie	Başer <i>et al.</i> , 1999	HD	Isomenthone (32,1-43,8%/41,7-52%), menthone(26.6-57,3%/25,1-59,1%)
	Sarikurkcü <i>et al.</i> , 2012	HD	Pulégone (71,47%), menthone(7,67%)
	Yasa <i>et al.</i> , 2012		*Pulégone (34,6%), Pipériténone (31,4%), isomenthone (17,9%), pipéritone (9,7%) *Isomenthone (42,1 %), Pulégone (28,9 %), pipéritenone (11,8 %), pipéritone (11,6 %).
Tunisie	Mkaddem <i>et al.</i> , 2007	HD	Pulégone (41,8%), Isomenthone (11,3%), Carvone (6,2%)
	Hajlaoui <i>et al.</i> , 2009	HD	Pulégone (61,11%), isomenthone (17,02%), Pipéritone (2,63%)
Egypte	El-Ghorab, 2006	HD	Pulégone (43,5%), pipéritone (12,2%)
Bulgarie	Stoyanova <i>et al.</i> , 2005	HD avec EV	Pulégone (42,9-45,4%), pipéritenone (21,7-23,1%), isomenthone (11,3-12,8%)
	Stoyanova <i>et al.</i> , 2005	HD	Pipériténone(27,2-49,7%/19,4-57,7%)
Iran	Aghel <i>et al.</i> , 2004	HD	Menthone (37,8-20,3%)
	Mahboubi and G. Haghi, 2008	HD	Pipéritone (38,0%), pipéritenone (33,0%), α -terpineol (4,7%), Pulégone (2,3%)
	Khalilipour and Dejam, 2014	HD	Pulégone (46,18%), Pipériténone (19,56%), 1.8-cineole (4,55%), oxyde de Pipériténone (4,23%)
	Khosravi Zanjani <i>et al.</i> , 2015	HD	Pulégone (19,89%), cineole (19,38%), Pipériténone (15,14%)

Brésil	Silva <i>et al.</i> , 2015	HD	Pulégone (50,01%), menthol (31,90%), menthone (16,56%)
Inde	Agnihotri <i>et al.</i> , 2005	HD	Pulégone (65,9-83,1%), Menthone (8,3-8,7%)
Japon	Fujita and S. Fujita, 1967	HD	Menthone (50,5/26,4%)
Espagne	Lawrence, 1978	HD	Pulégone (79,4%), menthone(16%), isomenthone (8,6%)
Uruguay	Lorenzo <i>et al.</i> , 2002	HD	Pulégone (73,4%), isomenthone (12,9%)
France	Sutour, 2011	HD	Pulégone (87,7%), pipéritenone (2,9%), menthone (1,7%)

1.2.3 Utilisation

Le pouliot est une des Menthes sauvages les plus agréablement parfumées ; sa senteur citronnée persiste bien au séchage et son infusion est une des plus délicieuses qui soient.

- **médicinales**

Il a de nombreuses propriétés médicinales, comme d'être un bon expectorant et un sédatif de la toux, à la fin d'un repas, une infusion de Pouliot facilite beaucoup la digestion, combat les fermentations, les lourdeurs de tête ; c'est l'une des meilleures boissons digestives, très salutare, en particulier à ceux qui souffrent d'insuffisance hépatique.

- **Insecticides**

Des infusions concentrées de feuilles de menthe pouliot ont longtemps été utilisées pour lutter contre les ectoparasites de l'homme. Elles étaient particulièrement employées pour détruire les poux de tête et les puces (**Arvy *et al.*, 2003**).

La plante entière possède des propriétés insecticides utilisées autrefois en médecine vétérinaire pour préserver les chiens contre les tiques (*Ixodes*) et les puces (*Pulex*).

Toutefois, il faut savoir que l'application de grandes quantités d'huile essentielle de pouliot sur la peau peut s'accompagner d'une absorption significative suivie d'une intoxication à la pulégone. La mort d'un chien de 30 kg a été rapportée à la suite d'un traitement contre les puces de 60 mL d'huile de pouliot (**Hayes *et al.*, 2006**). Malgré un shampoing administré au bout d'une heure et une prise en charge par un vétérinaire, il eut des syncopes et succomba.

- **Culinaire**

Cette plante est aussi très utilisée dans la cuisine portugaise comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques.

En Algérie, le pouliot entre dans un certain nombre de plats. Le rfiss est un mets sucré à base d'une galette émietlée ; une variété, le *rfiss el aachab*, traduit par « rfiss aux herbes », est préparé avec une grande variété d'herbes et de plantes comme le pouliot ou l'origan.

Batata fliou, un plat traditionnel algérien originaire de la région de Blida, est un ragoût de pommes de terre à la Menthe pouliot, ainsi que sardine bel fliou (sardines à la menthe pouliot). On peut citer encore : tikourine (boulette de semoule), mdecha (soupe).

En Italie et Espagne, très utilisée pour la confection des bonbons.

C'est une plante mellifère, très visitée par les abeilles pour son nectar.

1.2 *Mentha rotundifolia*

1.2.1 Taxonomie et description

Classification Selon Cronquist (1981)	Classification APG III
Règne : Plantae	Clade : Spermatophyta
Division : Magnoliophyta	Clade : Angiospermes
Classe : Magnoliopsida	Clade : Dicotylédones vraies
Ordre : Lamiales	Clade : Asteridées
Famille : Lamiaceae	Clade : Euastéridées I
Genre : <i>Mentha</i>	Ordre : Lamiales
Espèce : <i>Mentha x rotundifolia</i> (L.)Huds	Famille : Lamiaceae
	Genre : <i>Mentha</i>
	Espèce : <i>suaveolens</i>
	Sous Espèce : <i>subsp. suaveolens</i>
	Nom Latin : <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. <i>subsp. suaveolens</i>
	Nom Français : Menthe à feuilles rondes
	Nom Anglais : Round-leaved mint



Figure 2 : *Mentha x rotundifolia* (L.)Huds

[//fr.wikipedia.org/wiki/Menthe_odorante#/media/File:Mentha_rotundifolia.2018](https://fr.wikipedia.org/wiki/Menthe_odorante#/media/File:Mentha_rotundifolia.2018)

Mentha rotundifolia, dont le nom vernaculaire est « timarssat » en longue arabe, est un hybride de *Mentha longifolia* et *Mentha suaveolens* (Kokkini et papageorgiou, 1988 ; Lorenzo et al., 2002) alors que pour d'autres auteurs *Mentha rotundifolia* et *Mentha suaveolens* correspondent à la même espèce (Hendriks et Van Os, 1976).

La menthe à feuilles rondes ou *Mentha rotundifolia* est une plante vivace que l'on trouve fréquemment au bord des chemins, dans les fossés ou autres lieux humides.

Elle ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes, épaisses et ridées. La tige, typique des labiées, est à section carrée.

L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher ; comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme. Les petites fleurs sont rassemblées en épis terminant les rameaux. La hauteur de la plante est de 25 à 80 cm, la fleur est de 5 mm de long.

1.2.2 Travaux ultérieurs sur la composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* est très variable. De nombreux composés, ainsi que leurs associations sont à l'origine d'une grande diversité de compositions chimiques décrits dans la littérature.

Le Tableau 2 recense tous les travaux réalisés sur la composition chimique des HE de *M. rotundifolia* dans le monde, en plus des localités, des composés majoritaires et leur mode d'extraction.

Tableau 2: Bibliographie des huiles essentielles de *M. rotundifolia* dans le monde.

Pays	Références	Méthodes	% Composés majoritaires
Algérie	Brada <i>et al.</i> , 2006	HD	Oxyde de Pipériténone (23.5-38.6%), oxyde cis-pipéritone (28.1-30.5%)
	Brada <i>et al.</i> , 2007	EV	Pipériténone (54.9%), oxyde de Pipériténone (17.6%)
Maroc	Ouzmil <i>et al.</i> , 2002		pulégone (50,0%)
	EL Arch <i>et al.</i> , 2003	HD	Pulégone (85%)
	Derwich <i>et al.</i> , 2010	HD	Menthol (40.50%), menthone (5.0%), acétate de menthyle (4.50%), menthofurane (4.20%), oxyde de pipéritone (3.80%)
	Ansari <i>et al.</i> , 2015	HD	Pulégone (69.1%) and menthone (18.5%)
Tunisie -Beja -Bizerte	Riahi <i>et al.</i> , 2013	HD	B-caryophyllene (26.67%), germacrene D (12.31%), carveol (7.38%). Pulégone (32.09%), oxyde de Pipériténone (17.28%), 5-acetylthiazole (11.26%)
Japon	Shimizu, 1956	HD	Cétone (Rotundifolone)
	Shimizu, 1957	HD	Rotundifolone
	Fujita and Nezu, 1985	HD	Oxyde de Pipériténone (85.1-1.3%), oxyde de pipéritone (6.8-52.0%)
Grèce	Kokkini and Papageorgiou, 1988	HD	Oxyde de pipéritone, acétate de méthyle
China	Fujita and K. Nezu, 1985	HD	oxyde de pipéritone, oxyde de pipéritone, 1,2-époxy neomenthyle
	Wang <i>et al.</i> , 2013	HD	Cis -jasmone (36.77%), germacrene D (11.89%), β -ocimene (10.51%), viridiflorol (8.20%).
Japon	Lawrence, 2007		l'oxyde de pipériténone (87,3%)
Uruguay	Lorenzo <i>et al.</i> , 2002	HD	Oxyde de Pipériténone (80.8%)
Cuba	Pino <i>et al.</i> , 1999	HD	2,4 (8) ,6-p-menthatrien-2,3-diol (14.5%), germacrene D (12.4%).
Romania	Moldovan and Oprean, 2014	EV	Carvone (51.79-73.56%)
Palestine	Oka <i>et al.</i> , 2000	EV	Isomères du 1,2-époxy menthyle acétate (74%), pipéritone (13%)
Espagne	Raya <i>et al.</i> , 1990	HD	Rotundifolone (10.4%) et piperitol (57.6%)
Argentine	De la Torre et Torres, 1977		Menthol (48,3%)

1.2.3 Utilisation

- Usages médicaux traditionnels

La menthe à feuilles rondes est utilisée traditionnellement dans le bassin méditerranéen pour ses effets toniques, stomachiques et antispasmodiques. Les herboristes, même s'ils

connaissent parfaitement les diverses espèces de menthes, traitent des propriétés de « la Menthe » de manière collective (**Lieutaghi, 1966**).

- **Culinaire**

Les feuilles fraîches sont utilisées comme condiment ou comme décoration. Elles servent à parfumer certains plats méditerranéens, comme le taboulé (**Arvy et al., 2003**).

2. Huiles essentielles

L'association française de normalisation (**AFNOR**) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR, 2000**). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

D'après **Bernard et al. (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

Bruneton (1995), définit les termes les plus couramment utilisés dans ce domaine, tels que :

Pommade florale

C'est un corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par enfleurage à froid, soit par enfleurage à chaud.

Résinoïde

C'est un extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux.

Absolu

C'est un produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction à l'éthanol et à température ambiante. La

solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but d'éliminer les cires.

Epices

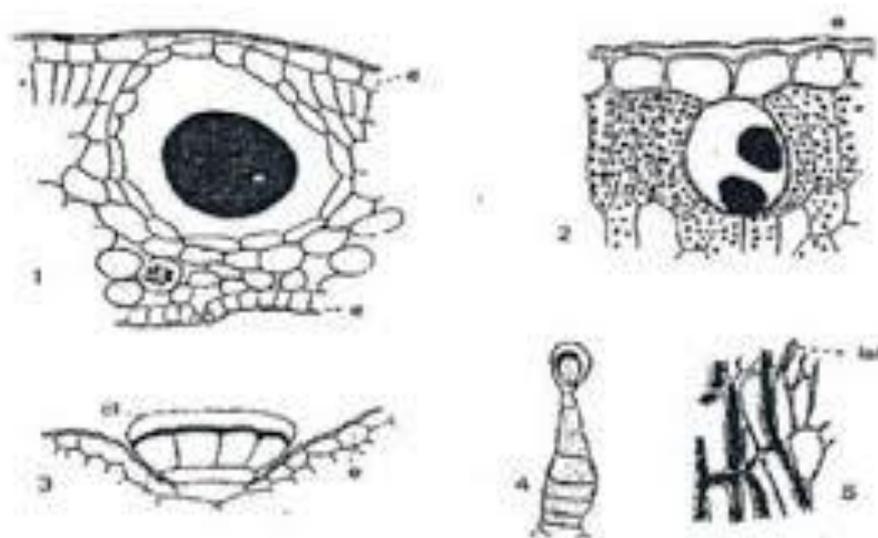
C'est des produits végétaux naturels ou mélanges de ceux-ci, sans matières étrangères, qui sont utilisés pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments ; le terme s'applique à la fois au produit entier et au produit en poudre.

Concrète

C'est un extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par des procédés physiques.

2.1 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les géraniacées etc. Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (cas des lauracées et magnoliacées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. On peut citer, par exemple, les poils sécréteurs des lamiacées, les poches sécrétrices des rutacées et les canaux sécréteurs des conifères. L'appareil sécréteur peut être externe, comme dans bon nombre de lamiacées, ou bien interne, comme c'est le cas pour les différents eucalyptus (myrtacées) (**Klayman, 1985 ; Ferreira *et al.*, 1996**).



1, poche sécrétrice dans une feuille d'Eucalyptus globules (Myrtacées) ; 2, cellule isolée située sous l'épiderme, e, de la famille de Saussurea officinalis (Lauracées) ; 3. Poil de menthe poivrée (Mentha piperita, Lamiacées) : l'essence (en noir) s'accumule sous la cuticule. Et .très épaisse ; 4, poil de patchouli (Pogostemon. lamiacées) ; 5. Laticifères, lat., dans la racine de Salsifis (Asteracées).

Figure 3 : Structures histologiques des plantes (Guignard, 1996).

Les huiles essentielles s'accumulent dans tous les types d'organes végétatifs: fleurs (bergamote), feuilles (menthe, eucalyptus), écorces (cannelle), bois (bois de santal), racines (vétiver), rhizomes (gingembre), fruits (anis) et graines (Noix de muscade). Les huiles essentielles sont généralement associées à un stockage spécialisé dans les plantes (**Bruneton, 1995**).

Bien que les huiles essentielles soient composées de plusieurs types de composés, les principales sont les monoterpènes (**Seigler, 1998**). La synthèse et l'accumulation de structures d'huiles essentielles sont situées près de la surface, des trichomes glandulaires, des cavités sécrétoires ou des canaux sécréteurs des plantes (**Bruneton, 1995**).

2.2 Composition chimique des huiles essentielles

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion.

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, (jusqu'à 1000 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose) (**Belaiche, 1979**). À côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (**Pibiri, 2006**).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et très variables de constituants qui appartiennent à deux groupes: les terpénoïdes et les composés aromatiques.

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de molécules organiques appartenant aux classes les plus diverses. Ces molécules sont généralement :

- **Hydrocarbures** : Au sein de ce groupe, on distingue les hydrocarbures aromatiques, monoterpéniques ($C_{10}H_{16}$) et sesquiterpéniques ($C_{15}H_{24}$) et plus rarement diterpéniques (C_{20}). Quelques fois on rencontre des hydrocarbures saturés (heptane, octane, nonane, etc.).

- **Composés oxygénés** : A l'intérieur de ce groupe on rencontre des alcools aliphatiques et cycliques, saturés et insaturés, des éthers oxydes, des phénols, des aldéhydes, des cétones, des esters, des acides, des aldéhydes -phénols, des lactones, des composés sulfurés (**Hazzit, 2006**).

Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faibles proportions dans la constitution de certaines huiles essentielles : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles, flavonoïdes, etc. (**Bernard et al., 1988**).

Les composés terpéniques, quelle que soit leur provenance, sont issus de métabolites secondaires de l'acide mévalonique. Leur structure est généralement formée par un nombre entier d'unités (n), de méthyl-2-butadiène. Selon le nombre d'unités, nous pouvons réaliser la classification suivante : Un grand nombre de composés naturels de la famille des terpènes viennent des polymérisations et des remaniements d'un même précurseur l'isoprène, carburediénique à 5 atomes de carbone :

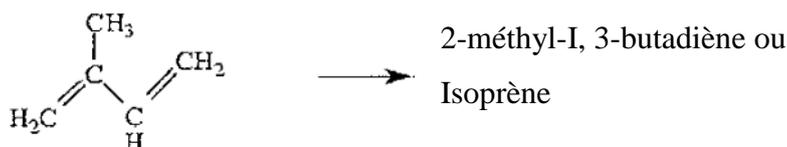


Figure 4 : Molécule d'isoprène

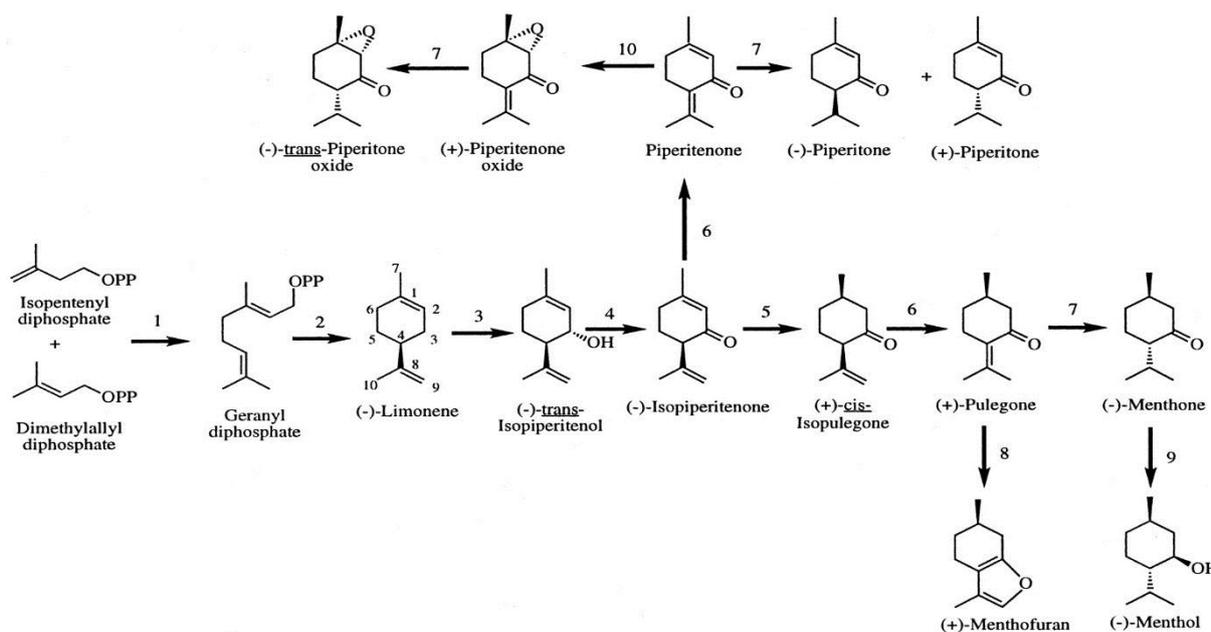
Selon le nombre d'isoprène, on distingue :

- Les monoterpènes (n=2), ce sont des hydrocarbures aromatiques, en (C_{10}) ;
- Les sesquiterpéniques (n=3), Ce sont des hydrocarbures aromatiques en (C_{15}) ;
- Les diterpènes (n=4), Ce sont des dérivés d'hydrocarbures aromatiques en (C_{20}).

2.3 Biosynthèse des monoterpènes chez les menthes

Les monoterpènes (C₁₀) sont les principaux composants des huiles essentielles de la famille de menthe (Lamiaceae) (Lawrence, 1981). La menthe poivrée (*Mentha × piperita*) a été développée comme model pour l'étude du métabolisme des monoterpènes (figure 5) en raison de la valeur commerciale de l'huile essentielle, du fait que la plante est clonale et facile à multiplier végétativement, et parce que l'huile est chimiquement complexe et la voie biosynthétique implique essentiellement tous les réactions représentatives du métabolisme des terpénoïdes (Croteau et Gershenzon, 1994).

La biosynthèse et l'accumulation des monoterpènes chez les menthes est spécifiquement localisée dans les trichomes glandulaires (Gershenzon *et al.*, 1989, McCaskill *et al.*, 1992), et la voie provient des plastes (leucoplastes) des cellules sécrétrices de ces structures glandulaires hautement spécialisées, non photosynthétiques (Turner *et al.*, 1999).



Les enzymes responsables sont : (1) geranyl diphosphate synthase, (2) (4S)-(-)-limonene synthase, (3) Cyt P450 (-)-limonene-3-hydroxylase, (4) (-)-Trans-isopiperitenol dehydrogenase, (5) (-) isopiperitenone reductase, (6) (+)-cis-isopulegone isomerase, (7) (+)-pulegone reductase, (8) cytochrome P450 (+)-MFS; (9) (-)-menthone reductase; (10) terpenoid epoxidase.

Figure 5 : voies de biosynthèse des monoterpènes dans la menthe poivrée (Croteau et Gershenzon, 1994).

La famille des monoterpènes des produits naturels est donc dérivé de la voie plastidiale, indépendante du mévalonate pour le métabolisme des isoprénoïdes (Eisenreich *et al.*, 1997; Sagner *et al.*, 1998), qui fournit l'isopentényl diphosphate (et, par isomérisation, diméthylallyl

diphosphate) comme les précurseurs universels des terpénoïdes (**Lichtenthaler et al., 1997; Eisenreich et al., 1998; McCaskill et Croteau, 1999**).

Les monoterpènes divergent du métabolisme primaire par conversion de l'isopentényl diphosphate et du diméthylallyle diphosphate, via l'action de la prényltransférase géranyle diphosphate synthase, au géranyl diphosphate (**Burke et al., 1999**), qui subit ensuite une cyclisation par limonène synthase en (4S) - (-) -limonène (**Alonso et al., 1992**).

Le (-) -Limonène sert de précurseur oléfinique commun des terpènes d'huile essentielle de la menthe poivrée (**Kjonaas et Croteau, 1983**) au moyen d'une série de transformations secondaires, (**Croteau et Gershenzon, 1994**) (figure 5).

Dans la menthe poivrée, un microsomal cytochrome (Cyt) P450 limonène-3-hydroxylase introduit un atome d'oxygène dans une position allylique pour produire (-) - *trans* isopiperitenol et établir ainsi le schéma d'oxygénation de tous les dérivés ultérieurs.

Une soluble déshydrogénase NADP-dépendante oxyde l'alcool en une cétone, (-) - isopiperitenone, activant ainsi la double liaison adjacente pour la réduction par une soluble NADPH-dépendante, régiospécifique réductase pour produire le (+) - *cis*-isopulegone. Une isomérase déplace ensuite le reste de double liaison en conjugaison avec le groupe carbonyle produisant le (+) -pulegone. Une réductase NADPH-dépendante convertit ensuite (+) -pulegone en (+) -isomenthone et (-) -menthone, qui prédomine. Enfin, deux stéréosélectives Réductases NADPH-dépendantes transforment (-) -menthone et (+) -isomenthone à (-) -menthol et (+) -neoisomenthol, respectivement, et (-) -menthone et (+) -isomenthone à (+) -neomenthol et (+) -isomenthol, respectivement.

(-) - Le menthol prédomine grandement parmi les isomères mentholés (dépassant souvent 50% de l'huile essentielle) et est principalement responsable de la sensation de saveur et de refroidissement caractéristique de menthe poivrée.

2.4 Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries

pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en oeuvre de diverses techniques (**Joulain, 1994**).

L'analyse des huiles essentielles comporte généralement plusieurs séquences :

- La première séquence consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par chromatographie en Phase gazeuse (CPG); cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage «en ligne» d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles.
- Une deuxième séquence est mise en oeuvre lorsque l'huile essentielle est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant coéluer ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première séquence. Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones...).
- Enfin, une troisième séquence peut être mise en oeuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-1H) et du carbone-13 (RMN-13C), SM, IRTF... etc.

2.4.1 La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al., 1995**). C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Van Den Dool et Kratz, 1963**). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

Les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales (**Joulain et König, 1998 ; Adams, 1995**) ou répertoriés dans la littérature.

Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les variations les plus importantes sont observées lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature, particulièrement pour ce qui concerne la colonne polaire (**Grundschober, 1991**).

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification.

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

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. (**McLafferty et**

Michnowicz, 1992). Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge m/z (**McLafferty et Tureček, 1993; De Hoffmann et Charrette, 1999**). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Sile potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les chalcotrons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

2.5 Activités biologiques et utilisations des huiles essentielles

Les HE possèdent de nombreuses activités. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongiques, contre les dermatophytes (**Savajol, 2004**), celles d'origine bactériennes, par exemple contre les bactéries endocanalaies (**Savajol, 2004 ; Singh et al., 1988**) et au niveau de la microflore vaginale (**Ferreira , 1995**).

Elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

Les HE possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation

est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993**).

Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels. Selon **Bruneton (1995)**, la part des huiles essentielles dans l'aromatization ne cesse de croître au dépend des composés aromatiques de synthèse.

Un certain nombre de conservateurs alimentaires contenant des HE sont déjà commercialement disponibles. Le "DMC Base Natural" est un conservateur alimentaire produit par DOM CA S.A. (Alhendín, Granada, Spain) qui contient 50% des huiles essentielles de rosemary, sage et citrus et 50% du glycerol (**Mendoza-Yepes et al., 1997**).

“Protecta One” et “Protecta Two” produits par Bavaria Corp. (Apopka, FL, USA), sont classés comme des conservateurs alimentaires sains en USA, ils contiennent une huile essentielle ou plus, dispersé dans une solution de sodium citrate et sodium chloride, respectivement (**Cutter, 2000**).

2.6 Importance économique des huiles essentielles de menthes

D'après la base de données du World Trade Analyzer, les parfums et les HE représentent la dixième industrie parmi les dix industries d'importation croissant le plus rapidement dans le monde. Sa croissance annuelle moyenne est de 12,5 % durant la période 1985-2000. La croissance de cette dernière partant d'une base très restreinte (**Bousbia, 2004**).

Quatre pays dominant la scène internationale comme producteurs potentiels HE : le Brésil, l'Indonésie, la Chine, et l'Inde. Cette dominance est due à leur grande population et à leur consommation interne accrue d'HE, ainsi à leurs investissements dans la formation scientifique et technique, et enfin à leurs fortes positions économiques pour une gamme limitée de produits et le bon développement des entreprises d'exportation (**Bousbia, 2004**).

Les HE sont des précieux produits naturels utilisés comme matières premières dans de nombreux domaines, y compris les parfums, les cosmétiques, l'aromathérapie, Phytothérapie, épices et nutrition (**Buchbauer et al., 2000**). Les HE étaient utilisé dans la Rome antique, la Grèce et l'Égypte et tout au long Moyen et Extrême-Orient en tant que parfums, saveurs alimentaires, déodorants et produits pharmaceutiques (**Baris et al., 2006**). Les fleurs de *Mentha pulegium* ont été traditionnellement utilisées pour ses propriétés antiseptiques pour le traitement des maladies infectieuses (**Mohaddese et al., 2008**).

Les HE de menthe font parties des huiles les plus produites dans le monde dont la valeur commerciale s'élève à plus de 400 millions de \$US/an. Les États-Unis occupent une position

dominante et sont les plus gros producteurs d'huile essentielle de menthe, suivi par l'Inde et la Chine (**Sutour, 2010**).

Commercialement, les espèces de menthe les plus importantes sont la menthe poivrée (*M. x piperita*), la menthe verte (*M. spicata*) et la menthe de maïs (*M. canadensis*). De ces espèces, la menthe de maïs est cultivée uniquement pour la production de l'huile (**Small, 1997 ; Oudhia, 2003**).

Les menthes sont utilisées en médecine traditionnelle dans les pays producteurs. En Chine, *M. canadensis* était utilisée pour traiter des ennuis de santé comme la fièvre et les coups de chaleur. Aux U.S.A c'est la menthe poivrée (*M. piperita*) qui était utilisée pour lutter contre de simples migraines jusqu'aux brûlures intestinales (**Lawrence, 2007**).

Mentha canadensis est à l'origine de l'huile essentielle de « cornmint » (>15000 tonnes/an) qui est la plus grande source de (-)-menthol (**Aflatuni, 2005**), *M. piperita* donne l'huile essentielle de « peppermint » (> 3500 t/an) composée de menthol, de menthone et d'acétate de menthyle; *M. spicata* ssp. *spicata*, *M. viridis* (native spearmint) et *M. gracilis* (scotch spearmint) sont la source d'HE riches en carvone (**Kokkini et al., 1995**); *M. citrata* est une source de linalol et d'acétate de linalyle. Nous citons ici, certaines menthes très répandues mais qui présente un intérêt commercial plus limité : *M. pulegium* est à l'origine de l'HE « pennyroyal » riche en pulégone et l'huile essentielle de *M. aquatica* est dominée par le menthofurane. Afin de répondre à cette forte demande, de nombreuses espèces font l'objet de mise en culture. L'industrie agroalimentaire est le principal consommateur : liquoristerie, confiserie ainsi que l'industrie des tabacs et la parfumerie. La valeur commerciale des huiles essentielles de menthes, leurs facilités de propagation et de clonage, a poussé les recherches vers une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des monoterpènes caractéristiques des menthes. Cette étude a permis de favoriser la production de constituants d'un grand intérêt économique comme le menthol (**Sutour, 2010**).

Les produits naturels dérivés de plantes sont largement utilisés comme composés biologiquement actifs. Parmi eux, les HE étaient les premiers conservateurs utilisés par l'homme (**Thompson, 1989**). Beaucoup de ces mélanges bruts se sont révélés antifongiques, antimicrobiens, activités cytostatiques et insecticides (**Sivropoulou et al., 1995**).

Les HE extraites de l'espèce de menthe (*M. pulegium* et *M. spicata*), contenant principalement, pulégone, menthone et la carvone, ont été testés pour des activités insecticides et génotoxiques sur *Drosophila melanogaster*. L'HE de ces deux plantes aromatiques a montré une forte activité insecticide, alors que seule l'huile de *M. spicata* présentait une activité mutagène. Parmi les constituants étudiés, l'insecticide le plus efficace a été trouvé

pulegone, alors que le menthone est le plus efficace pour l'activité génotoxique. La forte toxicité de la pulegone est supprimée en présence de menthone (**Franzios et al., 1997**).

2.7 Marché des huiles essentielles en Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes aromatiques et médicinales, au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Ces espèces sont riches en HE et sont utilisées dans le domaine culinaire et en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, antidiarrhéiques et antibronchiques (**Bruneton, 1999**).

L'Algérie durant la période coloniale et après l'indépendance comptait parmi les pays producteurs exportateurs des HE provenant soit des cultures familiales ou des plantes spontanées.

Dès la fin des années soixante-dix où sa dernière exportation était d'environ 2 tonnes d'HE, la production est devenue quasiment inexistante. Actuellement, la production d'HE est limitée à quelques producteurs privés artisanaux, qui ne subvient pas aux besoins du marché national. De ce fait, l'Algérie a eu recours aux importations de cette matière pour couvrir ses besoins (**Bousbia, 2004**).

3. Régénération par les techniques de culture *in vitro*

3.1 Généralités

Les biotechnologies constituent, depuis quelques années, une importante composante de toutes stratégies de recherche relatives à la multiplication et/ou à l'amélioration génétique des espèces végétales. En effet, devant une demande quantitative toujours croissante et qualitative de plus en plus restrictive, les techniques classiques encore employées aussi bien pour la multiplication que pour l'amélioration génétique des végétaux sont relativement lentes et toujours limitées (**Chaari khris et al., 2008**).

La technique de culture *in vitro* (appelée aussi micropropagation), une branche de la biotechnologie végétale, est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Ils'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et d'autre part des conditions de culture parfaitement

contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité... etc).

Théoriquement, n'importe quel type d'organe (bourgeon, feuille, racine...) ou fragment d'organe, prélevé sur une plante, peut être cultivé sur milieu nutritif synthétique approprié et produire la plante-mère de départ.

La micropropagation est une technique qui présente d'énormes avantages comparativement aux méthodes de multiplication classiques. Parmi ces avantages nous pouvons citer :

- ✓ Son applicable à un large éventail de plantes;
- ✓ L'obtention d'un grand nombre de plantes;
- ✓ Intérêts économiques : coût d'entretien des pieds mères moins important, rapidité des récoltes avec ce processus;
- ✓ obtention de plantes saines, indemnes de maladies;
- ✓ faible encombrement des cultures;
- ✓ facilité dans le contrôle des facteurs du milieu;
- ✓ souplesse de la production vis à vis de la demande;

Ce sont aussi des cultures qui se pratiquent indépendamment des saisons.

La multiplication *in vitro* des plantes peut emprunter des voies très différentes soit en provoquant et en accélérant le débourrement axillaire normal des explants (chaque bourgeon constitue potentiellement une nouvelle plantule : c'est le microbouturage), soit en provoquant l'apparition des bourgeons adventifs en des endroits inhabituels (caulogénèse), soit en favorisant la différenciation d'embryons (embryogénèse somatique) comparables aux embryons zygotiques des graines (**Zrýd, 1988**).

Les approches expérimentales utilisées pour la propagation des plantes médicinales et aromatique par la culture de tissu peuvent être divisées en trois grandes catégories. L'approche la plus commune est l'isolement des méristèmes organisés, ce système de propagation est désigné généralement sous le nom de la micropropagation. Dans la deuxième approche, des pousses adventives sont lancées sur des segments de feuille, de racine et de tige ou sur les cals dérivés de ces organes. Le troisième système comporte l'induction de l'embryogénèse somatique (**Rout et al., 2000**). Le passage par le cal est une étape primordiale en sélection *in vitro*, il est une source importante de variabilité génétique (**Mzouri et al., 2000**).

3.1.1 Milieux de culture de base

Bien que plus de 50 formulations de milieu différentes ont été utilisées pour la culture *in vitro* des tissus de différentes espèces végétales (**Gamborg et al., 1976; Huang et Murashige, 1977**), la formulation décrite par **Murashige et Skoog (1962)** (milieu MS) est le plus couramment utilisé.

Fondamentalement, un milieu nutritif consiste de tous les éléments nutritifs essentiels majeurs et mineurs des plantes, des vitamines, des régulateurs de croissance des plantes et un hydrate de carbone comme source de carbone avec d'autres substances organiques comme additifs facultatifs.

La composition de différents milieux nutritifs et la nature, la source et l'utilisation des ingrédients ont été discutés en détail par **Murashige (1974)** et **Torres (1989)**.

3.1.2 Substances de croissance

Les niveaux et les types de régulateurs de croissance des plantes inclus dans le milieu de culture déterminent en grande partie le succès du travail de culture tissulaire. L'initiation des racines et des pousses et le processus de différenciation à partir de tissu de cal non organisé, sont étroitement réglementés par les concentrations relatives des auxines et de cytokinines dans le milieu (**Ammirato, 1983; Bajaj et al., 1988; Rout et Das, 1997; Skoog et Miller, 1957**).

Le rapport d'auxine: cytokinine de ~10 produit une croissance rapide de cal indifférencié, un rapport de ~100 favorise le développement de la racine et un rapport de ~ 4 favorise le développement des pousses (**Murashige, 1980**). Les gibbérellines stimulent la croissance des organes mais généralement ne favorisent pas l'initiation des organes.

3.1.3 Conditions d'incubation

La lumière, la température et l'humidité relative sont des paramètres importants dans l'incubation de la culture. L'activité photosynthétique n'est pas très importante pendant les phases initiales de culture *in vitro* mais à des stades ultérieurs le matériel de culture est induit à devenir autotrophe dans une certaine mesure.

La lumière est essentielle pour les processus morphogénétiques comme l'initiation des pousses et racines et l'embryogenèse somatique.

La qualité et l'intensité de la lumière ainsi que la photopériode sont très critiques pour le succès de certaines expériences culturelles (**Murashige, 1977**). L'exposition à la lumière pendant 12-16 h par jour fournie par les lampes fluorescentes fraîches et blanches est habituellement recommandée. La lumière claire favorise la formation des pousses tandis que la lumière rouge induit l'enracinement dans de nombreuses espèces (**Murashige, 1977**). La température habituellement utilisée dans la salle d'incubation de la culture est d'environ 25°C. Les espèces tropicales nécessitent habituellement une température plus élevée (27-30 °C; **Tisserart, 1981**).

3.2 Micropropagation des espèces de Menthe

La micropropagation ou la culture de tissus végétaux est une méthode très efficace pour la propagation de la masse végétale. Les techniques de culture tissulaire sont adaptées pour étendre aussi la propagation de plantes commerciales. Plusieurs travaux (**Jain et al., 1991**, **Calvo et Sanchez-Gras, 1993**) ont rapporté l'influence des conditions de croissance *in vitro* sur la biosynthèse des métabolites secondaires des terpènes.

Plusieurs milieux ont été sélectionnés pour leur aptitude à l'induction des pousses et des racines, le développement et la propagation rapide de la menthe *in vitro*. Les milieux utilisés étaient habituellement basés sur les sels de MS (**Murashige et Skoog, 1962**) avec différentes hormones.

Holm et ses coauteurs (1989) ont étudié l'effet des sels de MS avec plusieurs hormones et régulateurs sur la croissance de la menthe poivrée. La benzylaminopurine (BAP) et la kinétine ont été utilisées en tant que cytokinines, l'acide indole-3-acétique (AIA) et l'acide naphthalèneacétique (ANA) ont été testés comme auxines. Selon cette étude, il est peu probable qu'une augmentation de la concentration de BAP améliorerait le type auxiliaire de la croissance de *M. x piperita*. L'élargissement de la cellule anormale avec BAP pourrait indiquer le début du développement des pousses adventives.

Selon **Phatak et Heble (2002)**, les explants de disque foliaire de *M. arvensis*, ont produit le plus grand nombre de pousses en milieu MS avec la BAP (5 mg/l) et Kinétine (5 mg/l).

Les pousses isolées ont été bien enracinées à de faibles concentrations de cytokinine, telles que BAP, Kin et thidiazuron (TDZ) à 0,5 mg/l, tandis que des concentrations plus élevées (5 mg/l) inhibent l'enracinement.

Ravishankar et Venkatarman (1988) ont rapporté la propagation rapide des bourgeons, pousses et racines chez *M. x piperita*. Les bourgeons auxiliaires ont été trempés dans de l'eau

pendant 3-4 heures et cultivé sur du milieu **Murashige et Skoog (1962)** contenant du charbon actif, 3% saccharose et une gamme de phytohormones. L'ajout d'IAA, 2.4-D et NAA au milieu MS induit la formation de plantules. L'acide indole butyrique (IBA) a donné une croissance vigoureuse avec de multiples pousses, qui ont formé des racines lorsqu'elles sont transférées sur un milieu additionné d'ANA.

3.3 Production des métabolites par culture *in vitro*

Actuellement, la majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques ou alimentaires sont extraites directement de la plante entière cultivée en serre ou en plein champ. Ces molécules, appelées métabolites secondaire, sont généralement produites en faible quantité par les plantes (**Namdeo, 2007**). Par conséquent, il est difficile de les obtenir en grande quantité par culture en serre ou en plein champ.

Les cultures de cellules végétales sont une source alternative attrayante pour toute la plante, pour la production de métabolites secondaires à grande valeur (**Ramachandra Rao, 1998 ;** Tableau 3).

Les cellules végétales sont biosynthétiquement totipotentes, ce qui signifie que chaque cellule en culture garde l'information génétique complète et, par conséquent, est capable de produire la gamme de produits chimiques trouvés dans la plante-mère.

La capacité des cellules végétales cultivées, tissus et organes pour produire et accumuler un grand nombre des composés chimiques de valeur que la plante parentale a été reconnu depuis la création des techniques de culture *in vitro* (**Karuppusamy, 2009**) et a donné lieu à de nombreuses tentatives d'utiliser des cellules végétales et tissus pour la production de métabolites d'intérêt (**Verpoorte et al., 2002**). Cependant, la demande croissante de produits naturels et renouvelables a recentré l'attention sur l'utilisation des techniques *in vitro* pour la production de ces composés (**Karuppusamy, 2009**). La biotechnologie permet de modifier génétiquement des cellules, tissus, organes ou des plantes entières cultivées *in vitro* pour favoriser l'accumulation de métabolites particuliers (**Rao et ravishankar, 2002**).

La culture *in vitro* de cellules végétales ou de tissus végétaux différenciés permet de contrôler une large gamme de paramètres contrairement à une culture en serre ou en champ ouvert.

Tableau 3: Additifs alimentaires provenant de cultures de cellulaires végétales
(Ramachandra Rao, 1998).

Type du produit	Espèces végétales
Colorants	
Anthocyanines	<i>Vitis vinifera</i> <i>Euphorbia spp.</i> <i>Daucus carota</i> <i>Perilla frutescens</i>
Betalaines	<i>Bambusa vulgaris</i> <i>Chenopodium rubrum</i>
Crocine	<i>Crocus sativus</i>
Crocétines	<i>Gardenia jasminoides</i>
Caroténoïdes	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Anthraquinones	<i>Cinchona ledgeriana</i> <i>Morinda citrifolia</i>
Naphthoquinones	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Aromes	
Vanilline	<i>Vanilla planifolia</i>
Ail	<i>Allium sativum</i>
Oignon	<i>Allium cepa</i>
Basmati	<i>Oryza sativa</i>
Saveur Citrus	<i>Citrus spp.</i>
Saveur Cocoa	<i>Theobroma cacao</i>
Additif alimentaire piquant	
Capsaïcine	<i>Capsicum frutescens</i> <i>Capsicum annum</i>
Edulcorants	
Stévioloside	<i>Stevia rebaudiana</i>
Acide glycyrrhizique	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Thaumatine	<i>Thaumatococcus danielli</i>
Huiles essentielles	
Huile de menthe	<i>Mentha x piperata</i>
Huile de camomille	<i>Maticaria chamomilla</i>
Huile de jasmin	<i>Jasmine officinale</i>
Huile d'anis	<i>Pimpinella anisum</i>

3.3.1 Huiles essentielles des plantes micropropagées

Selon **Holm et co-auteurs (1989)**, les menthes micropropagées avaient une teneur plus importante en menthol au cours de la première année que les plantes à multiplication conventionnelle, mais la deuxième année, la teneur en menthol était à peu près la même.

Selon **Phatak et Heble (2002)**, plusieurs pousses ont été régénérées sur milieu contenant des cytokinines et auxines et des pousses enracinées ont accumulées le pulegone comme constituant majoritaire (8%) au lieu du menthol suivi par l'isopulégone, le menthone et isomenthone. En revanche, les cultures de cals ont montré des traces de pulegone et d'isopulégone avec des concentrations de composés similaires tels que le menthol, le menthone et l'isomenthone. La teneur en huile variait de 1,1% à 2,6% dans les plantes à multiplication végétative et de 0,9% à 1,9% dans les plantes micropropagées.

Randhawa et ses co-auteurs (1988) ont signalé que l'application du régulateur de croissance l'acide gibbérellique (AG) n'augmente pas les rendements d'huile chez *M. x piperita* mais dans le cas de *M. spicata*, une concentration plus faible en acide indole acétique a donné un rendement significativement plus élevé que celui du contrôle.

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

1.1 Collecte et identification des espèces :

La récolte des deux espèces s'est faite auprès de populations spontanées de *Mentha pulegium* et *Mentha rotundifolia* situées à Beni Hamidene, 16km nord-ouest de Constantine (latitude: 36,51677 et longitude: 6,55028 et altitude d'environ 300m). Les plants servant à l'extraction des HE ont été récoltés au stade floraison en juin 2014, alors que ceux destinés à la micropropagation *in vitro* au stade juvénile au mois de mars de la même année.

L'identification botanique des 2 espèces a été réalisée par le professeur Hocine LAOUAR, département de Biologie, Université Ferhat Abbas Sétif. Les vouchers spécimens *Mentha pulegium* L. et *Mentha*×*rotundifolia* (L.) Huds ont été déposés au niveau du laboratoire de Culture *in vitro* végétale, Centre de recherche en biotechnologie (C.R.Bt), Constantine, sous les numéros MP 06110 et MR 0830, respectivement.



Figure 6: *Mentha rotundifolia* (à gauche), *Mentha pulegium* (à droite)

2. Micropropagation

2.1. Désinfection du matériel végétale de départ

Des parties de tiges avec des bourgeons (segments nodal) des deux espèces *M. pulegium* et *M. rotundifolia* ont été désinfectés sous la hotte à flux laminaire avec de l'hypochlorite de sodium (eau de javel à 10°) pendant 10min en présence de 2 gouttes de tween 20. Après

traitement dans l'alcool (éthanol 70%) pendant 30s, un rinçage à l'eau distillée stérile a été effectué.

2.2. Etablissement des cultures *in vitro*

Après désinfection, les tiges de *M. pulegium* et *M. rotundifolia* sont découpées sous la hotte à flux laminaire en fragments nodal. Ces derniers sont ensemencés à raison de 4-5 explants par pot de culture. Chaque pot contient environ 50mL de milieu de culture MS (**Murashige et skoog, 1962**) additionnée de 8g/L d'agar, de 30g/L du saccharose, avec différents équilibres hormonaux (BAP et GA3). Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture à une température de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité.

2.3. Multiplication des cultures

Après 3-4 semaines de culture, les *vitro plants* de *M. pulegium* et de *M. rotundifolia* sont découpés en fragments nodal et ensemencés dans un nouveau milieu de culture. Cette opération est renouvelée périodiquement jusqu'à obtention d'un stock de matériel végétal suffisant pour les autres expérimentations.

Puisque les pousses s'enracinaient spontanément, aucun autre traitement avec les auxines n'était nécessaire pour favoriser l'enracinement.

3. Acclimatation des *vitro plants*

Les *vitro plants* avec des racines bien développées ont été délicatement retirés du milieu de culture, lavés avec de l'eau distillée pour éliminer toutes traces de milieu nutritif et transférés dans des pots en plastique (diamètre 7cm) contenant du sable et de la tourbe (1:1). Les pots sont ensuite placés dans une chambre d'acclimatation à une température de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 16h de lumière, 8h d'obscurité et une humidité de 70%. Les plantules ont été irriguées par pulvérisation avec de l'eau distillée 3 à 4 fois par jour durant la première semaine, puis deux fois par semaine pour le reste de la période. L'irrigation est réalisée d'une manière alternée entre de l'eau distillée et une solution d'irrigation (1/10 solution minérale MS).

3.1 Etude de l'effet des conditions de stress dans la chambre d'acclimatation

Après 70 jours d'acclimatations (période estimée de floraison dans les conditions de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, photopériode de 16h de lumière et humidité de 70%), les plantules ont subi un stress abiotique (thermique, lumineux) pendant une semaine. L'objectif est d'évaluer l'influence de la température et l'exposition à la lumière/obscurité sur la composition, le rendement et les activités biologiques des huiles essentielles.

Les paramètres étudiés sont :

Cultures	Température	photopériode
Culture A	$23\pm 2^{\circ}\text{C}$	16h lumière/8h d'obscurité
Culture B	$16\pm 2^{\circ}\text{C}$	16h lumière/8h d'obscurité
Culture C	$35\pm 2^{\circ}\text{C}$	16h lumière/8h d'obscurité
Culture D	$23\pm 2^{\circ}\text{C}$	16h d'obscurité /8h lumière
Culture E	$23\pm 2^{\circ}\text{C}$	7 jours d'obscurité

Après une semaine de stress, les *vitro plants* sont découpés puis séchés à l'air libre en vue d'en extraire les huiles essentielles et de réaliser les analyses et l'évaluation biologique.

4. Extraction et analyse des HE

L'extraction et l'analyse des huiles essentielles ont été réalisées à partir de matériel végétal provenant des plantes à l'état spontané et les plantes de cultures.

4.1 Extraction des HE

L'extraction a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation utilisant un appareil de type Clevenger.

La matière végétale (100g), constituée de parties aériennes (feuilles et tiges) des espèces étudiées, est introduite dans un ballon de capacité 2L rempli avec 1L d'eau distillée. La distillation s'est étalée sur une période de 3 heures. L'huile essentielle recueillie est séchée avec du sulfate de sodium anhydre, conservée dans des tubes en verre hermétiquement fermés, puis stockés à l'abri de la lumière à une température de $4\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

4.2 Rendement de l'extraction

Le rendement en huile essentielle est exprimé par le rapport du volume d'huile essentielle recueillie en (mL) pour 100grammes de matière végétale sèche (mL/100g).

4.3 Analyse quantitative des huiles essentielles par CPG/MS

L'équipement utilisé est décrit comme suit :

- Description de l'équipement

L'analyse des huiles essentielles ont été effectuée par CPG-MS sur un appareil du type Hewlett Packard Agilent 6890 plus utilisant une colonne capillaire HP-5MS (5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane) avec les dimensions suivantes (L : 30m; Ø: 0,25mm ; EP: 0,25µm). La séparation a été faite par gradient de température, commençant à 60°C pendant 8min, puis augmentation la température par palier de 2°C/min jusqu'à 250°C, puis en stabilisant la température pendant 10min. Le volume d'injection est de 0,2µL en mode Split 10:1; Le détecteur FID est réglé à 250°C; l'Hélium pureté N 6 a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 0.5mL/min. Le CPG est couplé à un MS Hewlett Packard Agilent 5973 avec un mode de détection Scan TIC (de 30 à 550) avec une température de l'interface de 270°C (type d'ionisation : impact électronique, intensité du filament : 70ev, analyseur de masse Quadripôles; température de la source : 230°C).

- Identification des constituants des HE

L'identification des composantes des huiles essentielles est faite par détermination de leurs indices de rétention relative à ceux d'une série homologue de n-alcane C8-C28, et par référence à la base de données (**Wiley7n.l et NIST02.L**). La comparaison des spectres de masses obtenus à ceux cités par la littérature.

5. Activités biologiques des HE

L'évaluation des activités biologiques est réalisée sur le matériel végétal provenant des plantes à l'état spontané et les plantes de cultures.

5.1 Activité antioxydante des HE

Trois essais ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante; à savoir les tests à la DPPH, ABTS et CUPRAC, dans les conditions décrites comme suit :

5.1.1 Test au DPPH

Le test de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est réalisé sur une microplaque à 96 puits, en suivant la méthode décrite par **Brand et al. (1995) In Zaouali et al. (2010)**. Un volume de 40µL de chacune des dilutions des HE testées (10mg/mL à 0,156mg/mL), est mélangée avec 160µL d'une solution méthanolique de DPPH (4×10^{-5} M). Après une période d'incubation de 60mn à température ambiante, l'absorbance est lue à 517nm avec du méthanol comme témoin blanc et un mélange de 40µL de méthanol et 160µL de solution DPPH comme control (Figure 7).

Le pourcentage d'inhibition (**% d'inhibition**) est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}} / A_{\text{cont}}) \times 100$$

Où :

A_{cont} : Absorbance du control

A_{éch} : Absorbance de l'échantillon.

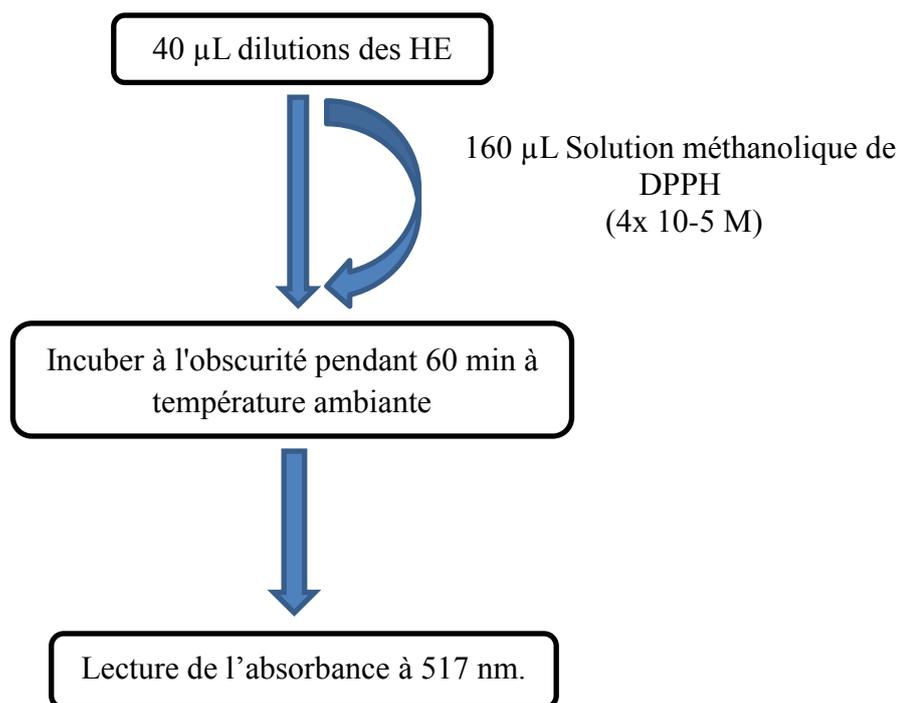


Figure 7: Schéma de piégeage du radical libre DPPH (Brand *et al.*, 1995).

5.1.2 Test à l'ABTS

Le test ABTS est réalisé par la méthode de **Re *et al.* (1999)**, modifiée comme suit (**Figure 8**) : L'ABTS est produit par la réaction entre 7mM d'ABTS dans H₂O et 2,45mM de persulfate de potassium. La solution ainsi préparée peut être conservée pendant plus de 2 jours à l'obscurité et une température ambiante. Avant utilisation, la solution ABTS est diluée pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm avec de l'éthanol. Un volume de 160µL de la solution d'ABTS est ajouté à 40µL de la solution de l'échantillon dissous dans du méthanol à différentes concentrations (10mg/mL à 0,156mg/mL). Après 10min, le pourcentage d'inhibition est lu par spectrophotométrie à 734 nm pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc (méthanol). L'Activité de piégeage ABTS est déduite de l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage ABTS}^+ (\%) = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

Où :

A_{cont} : Absorbance du control / $A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

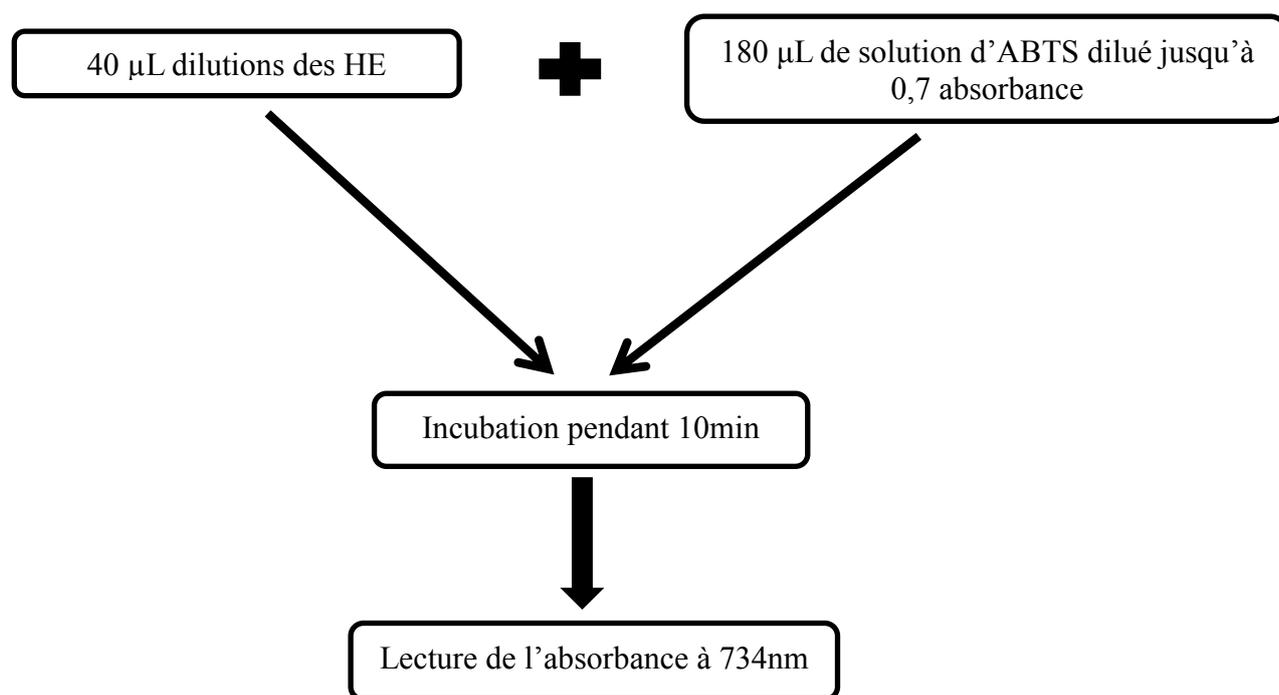


Figure 8: protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS+.

Re et al. (1999)

5.1.3 Test au CUPRAC:

Le test au CUPRAC est déterminé selon la méthode développée par **Apak et al. (2004)**. Le procédé consiste à mélanger 40µL de solution contenant l'échantillon avec plusieurs concentrations (10mg/mL à 0,156mg/mL) avec 50µL d'une solution de chlorure de cuivre (II), 50µL de solution alcoolique de néocuproïne et 60µL de tampon aqueux d'acétate d'ammonium à pH 7. Après 60 min, l'absorbance est lue à 450nm (Figure 9).

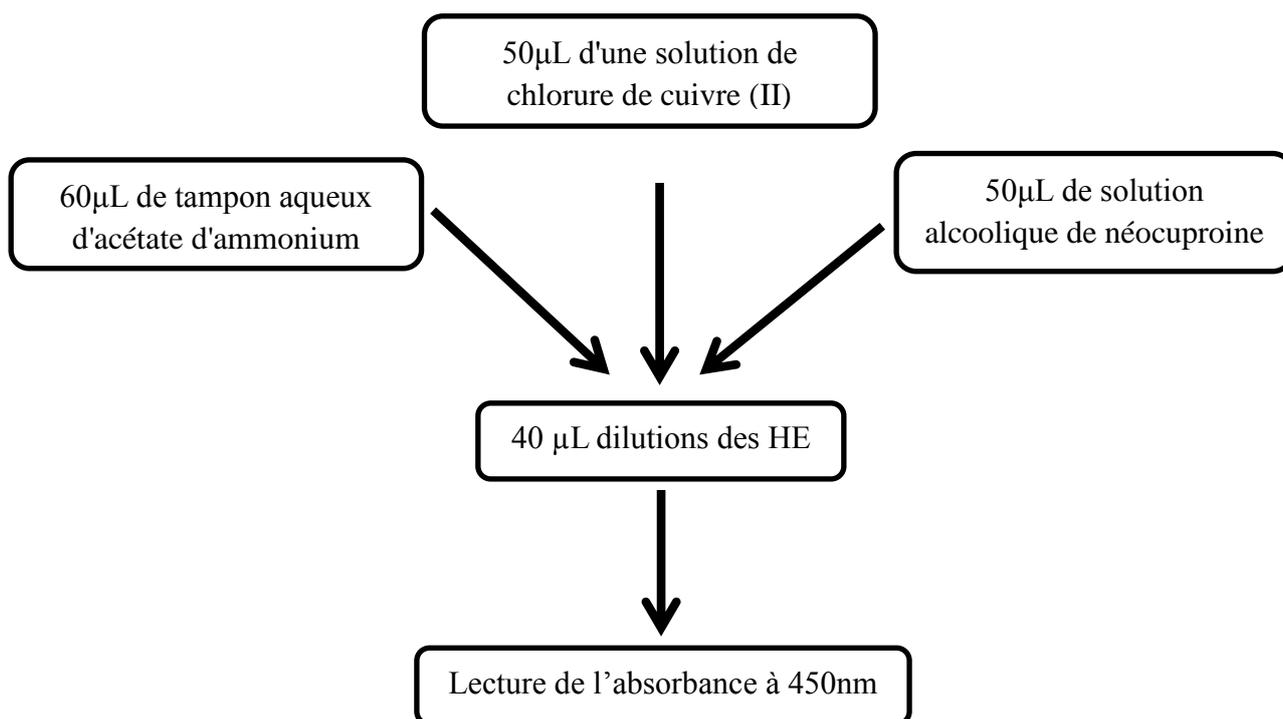


Figure 9 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits au CUPRAC

Apak et al. (2004).

5.2 Activité antimicrobienne des HE

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE étudiées, est réalisée selon la méthode pharmacopéiale de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose. Les tests ont été effectués au niveau du laboratoire de microbiologie du centre de recherche en biotechnologie. Constantine (**CRBt**).

5.2.1 Principe

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (Diamètre : 6mm) imprégné de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (mm ou cm) de la zone claire autour du disque (halo translucide), appelée : zone d'inhibition (Figure 10).

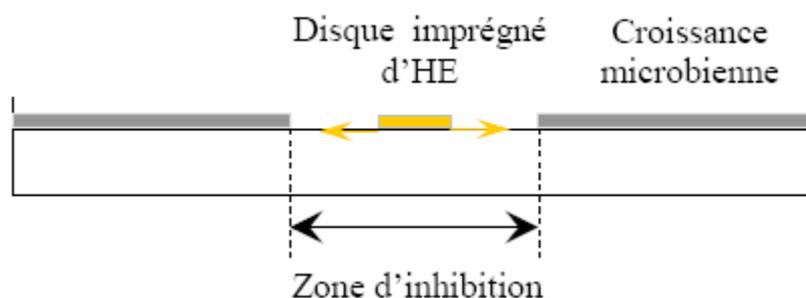


Figure 10: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes.

5.2.2 Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur 05 micro-organismes pathogènes appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie, Centre de recherche en biotechnologie (CRBt). Constantine. (Tableau 4)

Tableau 4: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	Bacillaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Staphylococcaceae
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	-	Enterobacteriaceae
<i>Candida albicans</i>	10231	levure	Saccharomycetaceae
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	champignon	Trichocomaceae

5.2.3 Protocole expérimental

5.2.3.1 Préparation de l'inoculum

➤ Pour les bactéries

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18H, les mettre dans 5mL d'eau physiologique stérile et agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la transmittance est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La valeur de la transmittance doit être comprise entre 22% et 32%, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/mL.

➤ **Pour les levures**

La préparation de l'inoculum pour les levures est la même que celle utilisée pour les bactéries sauf que, pour les levures, la culture doit être âgée de 48 h et que la valeur de la transmittance doit être entre 2% et 3%, ce qui correspond toujours à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/mL.

5.2.3.2 Examen de l'échantillon

➤ **Préparation de la première couche du milieu**

La fonte du milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud s'effectue dans un bain marie à 95°C, puis une première couche est versée aseptiquement dans des boîtes de Pétri (9mm) à raison de 15mL par boîte avec 3 répétitions par souche.

➤ **Préparation de la deuxième couche du milieu**

Après la fonte des milieux gélosés Muller-Hinton et le Sabouraud dans un bain marie à 95°C, on refroidir jusqu'à atteindre une température de 45°C, des flacons en verre stérile sont remplis avec 50mL du milieu Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50mL du milieu Sabouraud pour les levures. Des volumes de 200µL de chaque suspension sont ensuite prélevés pour ensemer les milieux de culture. Après agitation, 4 mL de chaque milieu est inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose. La seconde couche est étalée en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme.

➤ **Dépôt des disques**

Les disques en cellulose stérile, imbibées d'une quantité d'HE à tester (10µl), sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24H pour les bactéries et 25°C pendant 48H pour les levures.

6. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance et d'une analyse par le t-test (P=95%) en utilisant le logiciel IBM SPSS 21. Une classification APC et K-Médoid, ont été réalisées en utilisant un logiciel R. Tous les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant le logiciel : Excel (Microsoft Office 2007).

Partie III : Résultats et discussion

1. Micropropagation *in vitro*

1.1 Obtention des *vitro plants*

La première partie a porté sur l'obtention de *vitro plants* à partir de fragment nodal mis en culture sur milieu MS additionnée de différents équilibres hormonaux (BAP et GA3).

La méthodologie utilisée pour la stérilisation des explants était très efficace permettant l'établissement de cultures aseptiques avec un taux élevé de prolifération de pousses.

Les résultats de l'effet des équilibres hormonaux sur l'induction de pousses pour les deux espèces de *Menthe* sont reportés dans le tableau 5 :

Tableau 5: Effet de combinaisons d'hormones (BAP, GA3) sur l'induction de pousses.

Milieux	Combinaisons hormonales	Caractéristiques des <i>vitro plants</i>	
		<i>Mentha pulegium</i>	<i>Mentha rotundifolia</i>
M1	Aucun traitement	Pousses courtes avec des nœuds rapprochés	Pousses courtes avec des nœuds rapprochés
M2	0,5mg/L BAP + 0mg/LGA3	pousses moyenne avec des nœuds rapprochés	pousses moyenne avec des nœuds rapprochés
M3	0,5mg/L BAP + 1mg/LGA3	pousses moyenne avec des nœuds bien séparés	pousses moyenne avec des nœuds bien séparés
M4	1mg/l BAP + 0mg/L GA3	pousses longues avec des nœuds rapprochés	pousses longues avec des nœuds rapprochés
M5	1mg/L BAP + 1mg/L GA3	pousses longues avec des nœuds bien séparés	pousses longues avec des nœuds bien séparés

BAP : 6-benzylaminopurine

GA3 : Acide gibbérellique.

Dans cette étude, la première réponse des explants cultivés s'est manifestée par un élargissement initial ou gonflement des bourgeons axillaires préexistant, suivi par leur débourrement et le démarrage des feuilles après environ 7 jours de culture. Cela s'est poursuivi par un développement asynchrone des pousses. La culture des explants nodaux sur milieu additionné de différentes concentrations de cytokinine (BAP) a donné lieu à des réponses différentes notamment la longueur des pousses et la distance entre les nœuds (Tableau 5). La combinaison des hormones (1mg/L BAP, 1mg/L GA3) a donné la meilleure réponse quant aux caractères recherchés (Tableau 5).

Il est utile de remarquer que de notre cas les bourgeons axillaires démarrent même en milieu MS dépourvue de cytokinine. Cet effet peut être attribué à l'importante concentration en

cytokinine endogène au sein des explants de menthe, comme il a été mentionné auparavant dans des cultures d'*Argania spinosa* (Lamaoui, 2015). En outre, l'augmentation de la concentration en cytokinine à 1mg/L dans les milieux de culture induit la formation de plus de pousses à partir des bourgeons axillaires (Tableau 5). Il est bien établi que le débourrement des bourgeons et la prolifération des pousses au niveau des cultures d'explants nodaux dépend des cytokinines (Zryid, 1988). L'action des phytohormones dépend d'une part de la concentration de chacune d'entre elle à un endroit et à un moment précis, et d'autre part, des équilibres entre différentes phytohormones (Lydie, 2014). Le facteur le plus important qui influe sur la différenciation des bourgeons est le type de régulateur de croissance utilisé, en particulier la cytokinine (Zryid, 1988). Il est bien connu que la concentration de cette hormones dans le milieu de culture est critique pour l'organogénèse des pousses (Sun *et al.*, 2009), comme il a été auparavant établi pour la BAP et son rôle dans l'induction de multiples pousses (Paul *et al.*, 2010).

Les nœuds et la distance entre les nœuds sont primordiaux car ils servent de base de fixation pour les prochaines subcultures (Lamaoui, 2015). De notre étude, il ressort que la GA3 est efficace sur l'élongation des tiges. L'amorce de celle-ci a été observée après 3-4 semaines de culture. La concentration de 1mg/L GA3 dans le milieu de culture a donné le meilleur résultat (Tableau 5). Comme il a été établi, la GA3 stimule l'élongation des pousses par l'inhibition de l'action des auxines dans les régions méristhématiques et joue un rôle important dans le contrôle de la floraison (Taiz et Zeiger, 1998 ; Lydie 2014). L'effet promoteur de la GA3 sur l'élongation des pousses générées sur milieu contenant la BAP a été reporté dans plusieurs espèces (Purohit et Singhvi, 1998 ; Purkayastha *et al.*, 2008 ; Paul *et al.*, 2010).

L'amélioration de l'élongation des pousses, avant leur enracinement en micropropagation, est souvent induite par l'apport de gibbérellines dans les milieux de culture (Zryid, 1988).

L'acide gibbérellique, employé comme stimulant de la croissance des pousses, est considéré aussi comme un excellent activateur de l'enracinement comme la signalé dans le cas de *Prunus myrobolan* et *Prunus mogho* (Nemeth, 1979).

1.2 Multiplication des pousses

Les résultats de l'effet des équilibres hormonaux sur la multiplication de *vitro plant* pour les deux espèces de *Menthe* sont représentés dans le tableau 6:

Tableau 6: Effet de la BAP et la GA3 sur la multiplication de *vitro plant*.

Milieux	Equilibres hormonaux	Caractéristiques des <i>vitro plants</i>	
		<i>Mentha pulegium</i>	<i>Mentha rotundifolia</i>
M6	0mg/L BAP + 0mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> courts mal formé	<i>Vitro plants</i> courts mal formé
M7	0,5mg/L BAP + 0mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds rapprochés	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds rapprochés
M8	0,5mg/L BAP + 0,5mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds rapprochés, un taux de multiplication faible	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds bien distincts avec un taux de multiplication important
M9	0,5mg/L BAP + 1mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds bien distincts avec un taux de multiplication important	<i>Vitro plants</i> long, des nœuds bien distincts, un taux de multiplication faible
M10	1mg/L BAP + 0mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> de taille moyenne, des nœuds rapprochés	<i>Vitro plants</i> de taille moyenne, des nœuds rapprochés
M11	1mg/L BAP + 1mg/L GA3	<i>Vitro plants</i> de taille moyenne, des nœuds bien distincts	<i>Vitro plants</i> de taille moyenne, des nœuds bien distincts

BAP : 6-benzylaminopurine
GA3 : Acide gibbérellique.

Il ressort de la lecture du tableau 6 que pour l'espèce *M. rotundifolia*, la meilleure combinaison pour la multiplication des pousses est (0,5mg/L BAP+ 0,5mg/L GA3) alors que pour *M. pulegium*, la combinaison hormonale (0,5mg/L BAP+1mg/L GA3) a abouti au meilleur résultat. Ces observations montrent d'une part que la présence de la BAP est importante pour la multiplication des pousses de Menthe, comme il a été signalé auparavant (Calvo et Segura, 1989 ; Jordan *et al.*, 1999), et d'autre part, que les exigences en cytokinines pour la multiplication des tiges sont faibles par rapport à ceux nécessaire pour l'initiation des cultures.

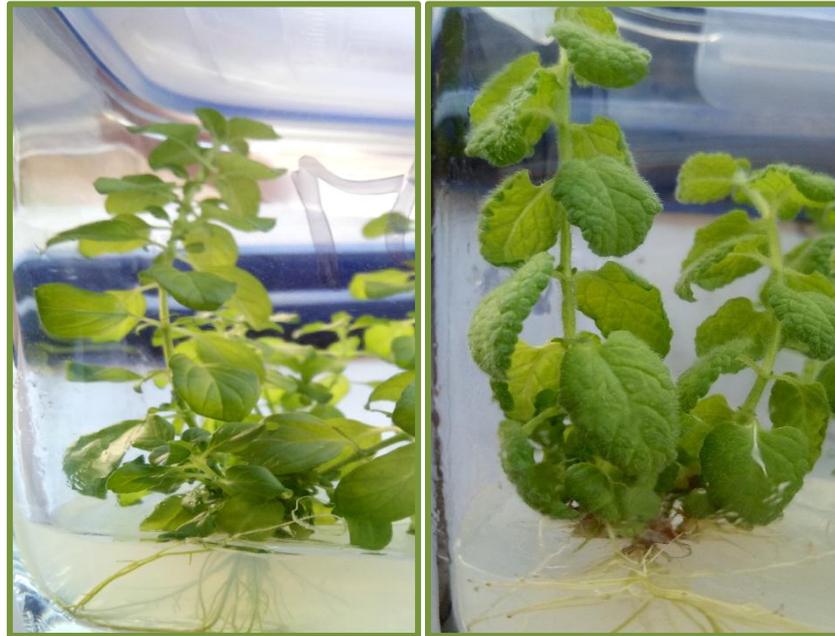
La diminution de la concentration de BAP, d'une dose élevée (1mg/L) pour la phase d'établissement des cultures à une dose réduite (0,5mg/L) pour la phase de multiplication améliore la prolifération et la qualité des tiges. Cette constatation a été auparavant rapporté dans des cultures d'espèces du genre *lavandula* (Echeverrigaray *et al.*, 2005 ; Zuzurate *et al.*, 2010 ; Lamaoui, 2015). Le taux résiduel de cytokinine présent dans les cultures peut en lui-même intervenir dans l'étape de multiplication (Lamaoui, 2015).

1.3 Enracinement des *vitro plants*

Dans notre travail, l'enracinement des pousses s'est fait spontanément pour les deux espèces (Figure 11). Cette observation est partagée par d'autres travaux (Jordan *et al.* 1998 ;

Zezurate et al., 2010), alors que d'autres études ont utilisé des milieux additionnés d'ANA pour augmenter significativement le nombre de racines (**Echeverrigaray et al., 2005**).

Notre résultat est important car d'une part, il permet un gain de temps, et d'autre part, il évite l'utilisation d'auxines qui sont connues pour induire la formation de callosités et les connexions vasculaires anormales entre les pousses et les racines adventives (**Nemeth, 1986**).



M. pulegium

M. rotundifolia

Figure 11: *Vitro plants* enracinés.

1.4 Développement des *vitro plants*

La croissance des plantules a été appréciée par différentes mesures de longueurs de tiges, du nombre de nœuds et de feuilles. Les trois paramètres ont été évalués en fonction du temps. Ainsi après 30 jours de culture sur le milieu à base MS, les *vitro plants* ont atteint :

-pour l'espèce *M. rotundifolia* ;

- une longueur moyenne de tige de **6,89cm**.
- environ **5,22** nœuds par *vitro plant*.
- environ **11,92** feuilles par *vitro plant*.

-pour l'espèce *M. pulegium* ;

- une longueur moyenne de tige de **5,03**cm.
- environ **6,31** nœuds par *vitro plant*.
- environ **20,80** feuilles par *vitro plant*.

Ces résultats sont similaires avec plusieurs travaux utilisant d'autres espèces (**Ariket et al. 2004 ; Zezurate et al., 2010**). Ces derniers auteurs ont démontré que les segments nodaux sont plus faciles à multiplier que les bourgeons axillaires, et que le plus grand nombre de pousses ayant une longueur supérieure ou égale à 0,5cm, pour les explants de segment nodal, a été obtenu dans un milieu additionné de 0,25mg/L BA.

2. Acclimatation des *vitro plants*

Selon notre étude, la micropropagation à travers les bourgeons axillaires a demandé une période minimale de 3 mois pour produire des *vitro plants* prêts pour le transfert au champ. Elle s'est faite dans une chambre d'acclimatation à une température de 23°C±1 avec une photopériode de 16h de lumière, 8h d'obscurité et un taux d'humidité de 70% (Figure 12 et 13).

Selon nos observations, la survie des *vitro plants*, pendant la période d'acclimatation est extrêmement liée à la qualité du système racinaire produit. Des taux de survie total dépassant les 96% sont observées pour deux espèces de Menthe. Les plantes acclimatées semblaient normales et ne présentaient aucune anomalie ou variation morphologique. Nos résultats sont similaires quant au taux de survie similaire pour d'autres où les valeurs de survie variaient entre 80 et 100% (**Arikat et al., 2004; Paul et al., 2010**)

Les *vitro plants* acclimatés pendant 70 jours ont servi, pour la moitié à l'extraction des HE et l'autre moitié, à des études des effets thermiques et lumineux sur les cultures.



Figure 12: Les étapes de l'acclimatation des *vitro plants* de *M. rotundifolia*

a : *Vitro plants* dans des pots de cultures ; b.1,b.2 : *Vitro plants* sortis du milieu de culture ; c : *Vitro plants* lavés ; d : transfert des *vitro plants* dans des pots contenant du sable et de la tourbe ; e : plantules après 20-25j dans la salle d'acclimatation ; f.1, f.2,f.3,f.4 : transfert des plantules dans des pots plus grand après 30j ; g.1,g.2 : plantules après 45j d'acclimatation ; h : plantules après 70j d'acclimatation.



Figure 13: Les étapes de l'acclimatation des *vitro plants* de *M. pulegium*

a : *Vitro plants* dans des pots de cultures ; b : *Vitro plants* sortis du milieu de culture ; c : *Vitro plants* lavés ; d : transfert des *vitro plants* dans des pots contenant du sable et de la tourbe ; e.1, e.2 : plantules après 20-25j dans la salle d'acclimatation ; f.1, f.2 : transfert des plantules dans des pots plus grand après 30j ; g : plantules après 45j d'acclimatation ; h : plantules après 70j d'acclimatation.

3. Effet des conditions d'acclimatation sur le rendement en HE

Les rendements d'extraction en HE exprimés par le rapport du volume d'HE recueillie en (mL) pour 100grammes de matière végétale sèche, sont regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7: Rendement en HE de la plante-mère et des *vitro plants*.

Matériels végétal	Rendement (mL/100g MV)*	
	<i>M. pulegium</i>	<i>M. rotundifolia</i>
Plante-mère	0,96 ± 0,57e	0,73 ± 0,06b
Culture A (23°C;16h/8h**)	0,94 ± 0,01e	0,89 ± 0,09b
Culture B (16°C;16h/8h)	1,16 ± 0,06d	0,88 ± 0,07b
Culture C (35°C;16h/8h)	1,84 ± 0,01a	1,48 ± 0,01a
Culture D (23°C;8h/16h)	1,37 ± 0,01c	1,49 ± 0,25a
Culture E (23°C;obs totale)	1,65 ± 0,01b	0,97 ± 0,01b

* Valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n= 3) ; Moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0,05)

Les résultats du Tableau 7 montrent que les *vitro plants* ayant subi un stress (thermique ou lumineux) ont donné des rendements significativement important en huiles essentielles par rapport à ceux du matériel végétal de la plante-mère et des *vitro plants* non stressés (Culture A) ou les rendements trouvés pour ces deux derniers sont comparables.

Ainsi, on peut remarquer que les cultures de *M. pulegium* et *M. rotundifolia* ayant subi une augmentation de la température de culture de 23°C à 35°C (Culture C), tout en maintenant un cycle de photopériode de 16h de lumière/8h d'obscurité enregistrent des augmentations significatives des rendements d'HE avec des valeurs de 1,84% et 1,48% respectivement, et ceci par rapport aux contrôles respectifs (Culture A) (0,94% et 0,89%).

De même, une réduction du temps d'exposition à la lumière (Culture D) tout en maintenant une température de 23°C, conduit à des augmentations significatives des rendements en HE pour *M. pulegium* et *M. rotundifolia* avec des valeurs de 1,37% et 1,49% respectivement, et ceci par rapport aux contrôles correspondants (culture A).

Dans les cultures E de *M. pulegium* exposées à une obscurité totale, les rendements en HE ont vu leur valeur passée de 0,94 (contrôle A) à 1,65%. Toutefois, aucun changement significatif n'a été observé dans les cultures E de *M. rotundifolia* soumis au même stress de l'obscurité (tableau 7).

Comme il a été reporté auparavant, les cultures des deux plantes dans des conditions non stressantes de température et de luminosité ont montré des rendements en HE comparables à ceux des plantes mères. Cette même constatation a été observée dans des cultures de *Mentha spicata* où des teneurs similaires en HE avec celle de la plante-mère ont été obtenues (**Hirata et al., 1990**).

Toutefois, d'autres études effectuées sur des cultures d'autres espèces de labiées ont signalé des taux en HE significativement élevés par rapport à ceux des plantes- mères (**Arafeh, 1999; Sudria et al., 1999**). Ces derniers auteurs postulent que le rendement élevé dans les *vitro plants* peut être due entre autre au taux résiduel de la benzyladenine (BA) observée dans des cultures de *lavandula dentata* (**Sudria et al., 1999**).

Les rendements élevés dans certaines cultures stressées par la température et la lumière sont cohérents avec l'idée largement admise que la lumière et la température constituent des facteurs importants (parmi d'autres) qui régulent la production des métabolites secondaires et en particulier celle des HE (**Clark et Menary, 1980**). De nombreux travaux sur l'HE de menthe poivrée ont montré que les rendements sont directement affectés par le cycle de la photopériode (**Allard, 1941 ; Langston et Leopold, 1954 ; Stewart, 1962**). Les jours courts produisent des plantes non épanouies, de petites feuilles et de nombreux stolons, tandis que les longues journées donnent des plantes dressées, de grandes feuilles, des fleurs et des rendements plus élevés en HE (**Clark et Menary, 1980**).

4. Effet des conditions d'acclimatation sur le profil chromatographique des HE

4.1 Observations faites sur *Mentha rotundifolia*

Les résultats de l'analyse par CPG/MS des HE de la plante-mère et des vitroplants sont illustrés dans le tableau 8. Il ressort que l'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* est caractérisée par la dominance de l'**oxyde de piperitenone** dont le taux est de 78,70% (Figure 14). Ce monoterpène oxygené est accompagné de quantités relativement plus faibles d'autres composants, comme le **limonene**, **β -pinene** et **trans-Caryophyllene** avec des teneurs de 1,55, 1,06 % et 1,36%, respectivement.

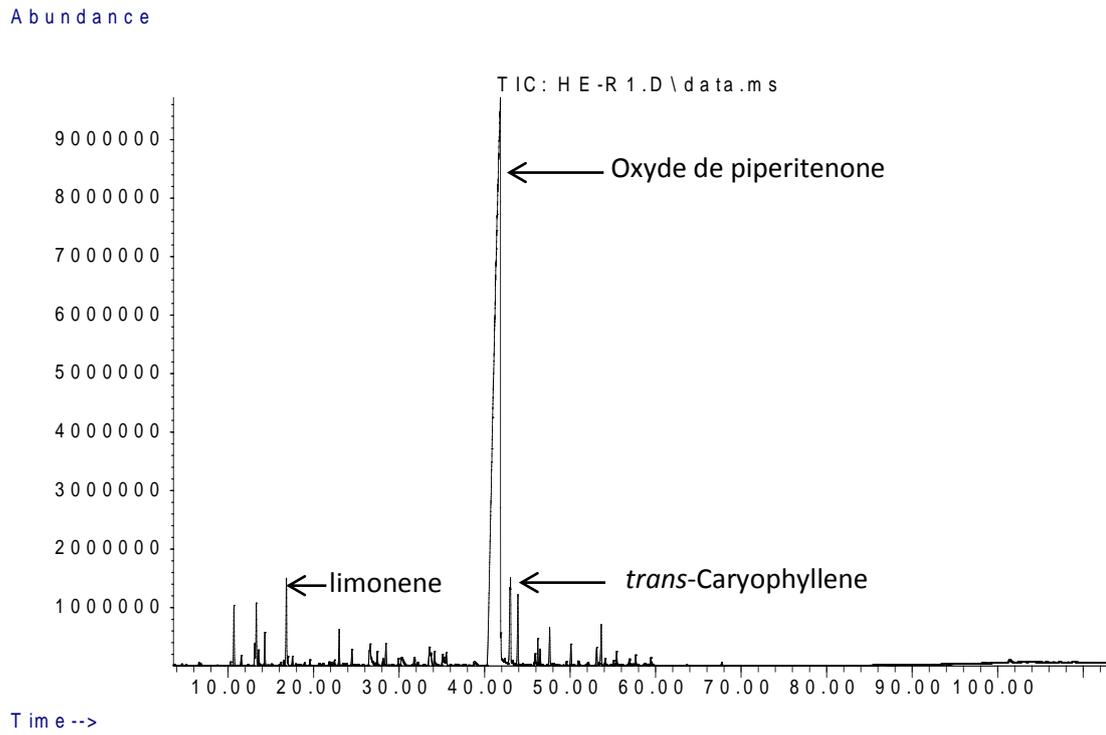


Figure 14 : Tracé chromatographique de l'HE de *M. rotundifolia* (plante-mère).

Tableau 8 : Composition chimique des HEs de la plante-mère et les *vitro plants* de *M. rotundifolia*.

Composés	RI	Pourcentage					
		Plante-mère	Plantes acclimatées				
			Culture A	Culture B	Culture C	Culture D	Culture E
Ethyl 2-methylbutanoate	843	0,05	0,31	0,16	0,12	0,07	0,19
α -Pinene	932	0,99	0,83	0,37	0,62	0,64	0,87
Camphene	946	0,18	-	-	-	-	-
Sabinene	971	0,39	0,36	0,14	0,13	0,30	-
1- β -Pinene	974	1,06	0,91	0,45	0,68	0,73	0,90
1-Octen-3-ol	979	0,32	0,57	-	-	0,17	0,21
β -Myrcene	990	0,54	0,43	0,09	-	0,32	-
Limonene	1027	1,55	0,95	0,54	5,78	0,46	0,68
Eucalyptol (1,8 cineole)	1030	0,14	0,26	0,11	-	0,15	0,24
Cis-Ocimene	1037	0,15	0,12	-	-	0,09	-
γ -Terpinene	1057	0,05	-	-	-	-	-
Trans-Sabinene hydrate	1266	0,11	-	-	-	-	-
1-Nonen-3-ol	1081	0,06	-	-	-	-	-
Cis-Sabinene hydrate	1097	0,08	-	-	-	-	-
Octen-1-ol, acetate	1110	0,60	-	0,45	0,48	0,73	1,84
1 Octen 3 yl acetate	1114	-	1,57	-	-	-	-
3-Octyl acetate	1126	0,04	0,31	0,10	0,11	-	0,40
Cyclohexanone, 3-vinyl-3-methyl-	1132	0,33	-	-	-	0,17	-
2,4,5-Trimethylfluorobenzene	1134	-	0,25	-	-	-	0,32
Borneol	1163	0,93	-	-	-	-	-
L-Menthone	1163	-	-	0,13	0,32	-	-
4-Terpineol	1175	0,34	0,14	-	0,22	-	-
p-Cymen-8-ol	1185	0,17	0,36	0,13	0,21	0,51	0,88
α -Terpineol	1189	0,43	0,08	-	0,19	0,17	0,16
α -Methyl cinnamic aldehyde	1210	0,13	0,06	-	-	-	-
(E)-2,3'-Dimethyl-5-(1',3'-butadien-1'-yl) furan	1216	0,39	-	-	-	-	-
Trans-(+)-Carveol	1219	-	-	-	0,24	-	-
Cis-3-Hexenyl isovalerate	1237	0,21	0,09	-	-	-	-
Pulegone	1238	-	-	-	0,18	-	-
l-Carvone	1243	0,07	-	-	0,21	-	-
1,1'-Bicyclopentyl	1263	0,53	-	-	-	0,55	0,16
3-Dodecyne	1263	-	0,66	-	-	-	-
3-methylcyclohex-3-en-1-one	1263	-	-	-	0,62	-	-
3-methyl- 2-Cyclopenten-1-one,	1265	0,28	-	0,19	-	0,23	-
2,4-Dimethylfuran	1266	-	0,27	-	0,36	-	0,31
Isophorone	1271	0,35	0,16	-	0,38	-	-
(1'-butenyl) Thiophene	1287	0,23	0,22	-	-	-	-
2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-	1291	0,29	0,11	0,14	0,12	-	-
2,5,5,8a-tetramethyl-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)	1291	0,29	0,11	0,14	0,12	-	-
Car-3-en-2-one	1340	-	0,33	-	-	-	-
Piperitenone	1341	0,22	-	-	-	0,32	0,31
Piperitenone oxide	1384	78,70	86,88	93,07	84,24	91,87	87,22
3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde, 3,4-dimethyl-	1396	-	-	0,17	-	-	-
Cis-Jasmone	1401	-	-	0,49	0,52	-	0,31
2-hydroxy-7-methoxy-4-methylcyclohepta-2,4,6-	1404	-	1,06	-	-	0,69	-
trien-1-one	1404	-	1,06	-	-	0,69	-
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde oxime	1415	-	0,12	0,47	-	0,16	0,70
Trans-Caryophyllene	1420	1,36	-	-	-	-	-
Trans- β -Farnesene	1457	0,45	-	-	-	-	-
(+)-Epi-bicyclosquiphellandrene	1462	0,29	0,10	-	-	-	-
β -Cubebene	1480	0,67	-	-	-	-	-
1s,cis-Calamenene	1520	0,42	0,22	0,24	0,10	0,15	0,16
α -Cadinene	1536	0,10	0,07	-	-	-	-
Trans-3,4-Dimethyl-1-cyclohexenecarbaldehyde	1555	-	0,18	-	-	-	0,21
3-Chloro-4-t-butyl-6-methylpyridazine	1572	0,41	0,25	-	0,18	0,23	-
Cyclohexanecarboxylic acid, 1-methyl-2-oxo-, ethyl	1572	-	-	0,26	-	-	0,38
ester	1572	-	-	0,26	-	-	0,38
Caryophyllene oxide	1581	0,85	-	0,11	0,13	-	0,19
Humulene oxide	1607	0,12	-	-	-	-	-
2H-1,4-Benzothiazin-3(4H)-one	1616	-	-	-	0,89	0,62	0,72
α -Cadinol	1653	0,21	0,14	0,15	0,09	-	-
14-Norcadin-5-en-4-one isomer B	1685	0,22	0,09	0,13	0,09	-	-
Monoterpènes		5,97	3,60	1,59	7,21	3,09	2,61
Monoterpènes oxygénés		81,28	89,99	94,43	85,92	93,02	89,59
Sesquiterpènes		4,47	0,53	0,50	0,32	0,15	0,35
Autres		3,74	4,34	2,20	3,76	2,90	4,81

Notes: RI: indice de rétention (abondance normalisée des pics de surface sans facteurs de correction);

Culture A (23°C, 16h.lum/8h.obs), Culture B (16°C, 16h.lum/8h.obs), Culture C (35°C, 16h.lum/8h.obs), Culture D (23°C, 16h.obs/8h.lum), Culture E (23°C, obs. totale (étiolement)).

Le profil du chromatogramme caractérisant l'HE de *M. rotundifolia* est similaire à celui décrit par d'autres études où l'oxyde de piperitenone était majoritaire (Nagell et Hefendeht, 1974 ; Umemoto *et al.*, 1994 ; Lorenzo *et al.*, 2002 ; Ouzmil *et al.*, 2002; Lawrence, 2007). toutefois, l'HE de cette espèce présente une variabilité importante reflétée par l'existence de plusieurs chemotypes à pulegone, carvone, menthol, piperitol ou d'autres composés (De la Torre et Torres, 1977 ; Perez-Raya, 1990 ; Avato *et al.*, 1995 ; Velasco-Negueruela, 1996 ; Galambosi *et al.*, 1998 ; Ouzmil *et al.*, 2002 ; El Arch *et al.*, 2003; Brada *et al.*, 2007; Lawrence, 2007).

Il faut savoir que l'oxyde de piperitenone tient une place importante dans le métabolisme de nombreuses espèces de menthes, puisque on le retrouve par exemple comme produit majoritaire dans les HE de *M. spicata* (Pino *et al.*, 1998) et *M. longifolia* (Venskutonis, 1996).

Dans notre étude, les *vitro plants* ont montré leur capacité à reproduire les principaux composés volatiles de la plante-mère. Une similitude des profils chromatographiques est observée entre les HE de *vitro plants* et celle de la plante-mère de *M. rotundifolia*. Toutes les cultures montrent comme constituant majoritaire l'oxyde de piperitenone (Figure 15) dont les taux varient entre 86,88% (culture A) jusqu'à 93,07% (culture B). Ces valeurs dépassent le taux de ce constituant dans la plante-mère (78,70%). La culture B soumise à un stress thermique de 16°C a enregistré le taux le plus élevé (93,07%).

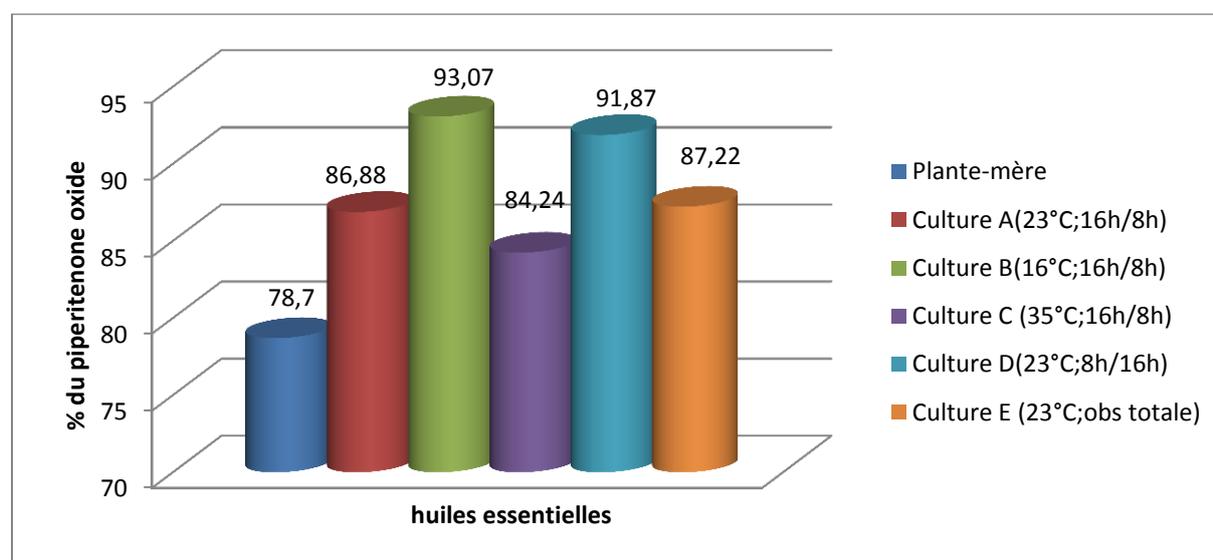


Figure 15: Teneur en % de l'oxyde de piperitenone dans les HE accumulés dans les cultures et la plante-mère de *M. rotundifolia*.

Le second et le troisième constituants présents dans l'HE de la plante-mère est le limonène et le *trans* caryophyllène où les pourcentages respectifs sont de 1,55 et 1,36%. Concernant le *trans* caryophyllène, les *vitro plants* soumises à différentes conditions de stress n'ont pas accumulées cette molécule dans des quantités détectables. Pour sa part, le limonène a été produit par tous les *vitro plants* avec un taux variant de 0,46% à 5,78%. Ce dernier taux en limonène, qui dépasse même celui de la plante-mère (1,55%), a été enregistré dans les cultures C, soumise à un stress thermique de 35°C. De plus le taux de cette molécule dans les autres cultures (A, B, D et E) est inférieur à celui produit dans la plante-mère.

En ce qui concerne le β -pinène, les taux enregistrés dans les cultures variaient de 0,45 à 0,91%, ce qui correspond à des pourcentages inférieurs à celui noté dans la plante-mère (1,06%).

A l'issue de l'expérience concernant les cultures soumises aux stress thermique et lumineux on peut émettre les remarques suivantes :

Effet de la température

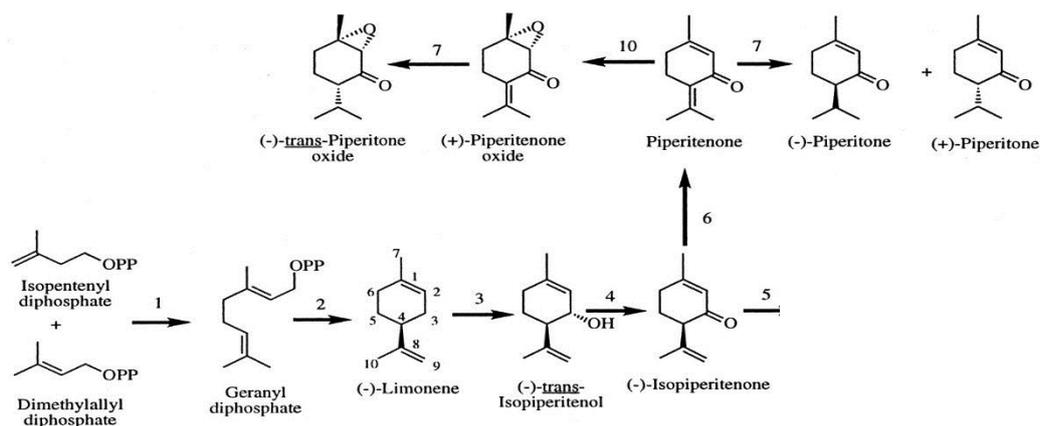
- la diminution de la température de culture de 23°C à 16°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal (16h.lum/8h.obs) a eu pour conséquence une augmentation du taux de l'oxyde de piperitenone qui passe de 86,88% (culture A) à 93,07% (culture B).
- l'augmentation de la température de culture à 35°C au lieu de 23°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal (16h.lum/8h.obs) a eu pour conséquence une augmentation du taux de limonène qui passe de 0,95% (culture A) à 5,78% (culture C).

Effet de la photopériode

- Le raccourcissement de la durée d'exposition des cultures à la lumière de 16heure à 8heure (Culture D), a eu un impact positif sur le taux d'oxyde de piperitenone par rapport au contrôle (culture A). Toutefois, les cultures soumises à l'obscurité totale (Culture E) n'ont pas vu le taux correspondant en oxyde de piperitenone augmenté par rapport à la culture précédente (culture D).
- Le raccourcissement de la durée d'exposition des plantes à la lumière (culture D) ou l'obscurité totale (culture E) n'a pas impacté positivement le pourcentage de limonène. Ce taux a enregistré même une diminution jusqu'à la valeur 0,46 et 0,68%, respectivement.

- La pipéritenone a été détecté seulement dans les cultures D et E où un stimulus lumineux a été effectué.

Le (-)-Limonène sert de précurseur oléfinique commun des terpènes d'HE chez le genre *Mentha* à travers d'une série de transformations secondaires (Figure 16) (Kjonaas et Croteau, 1983; Croteau et Gershenzon, 1994).



Les enzymes responsables sont: l'isopentényl diphosphate isomérase (1); le géranyl diphosphate synthase (2); 4S-limonène synthase (3); 4S-limonène-3-hydroxylase (4); et 4S-limonène-6-hydroxylase (5). La flèche brisée indique cinq étapes enzymatiques. OPP, fraction diphosphate.

Figure 16: Voie de conversion des unités isoprénoides C5 via le géranyl diphosphate et le limonène en principaux composants de l'HE (Croteau et Gershenzon, 1994).

L'absence du pipéritenone chez les cultures (B et C), pourrait être expliquée par sa conversion possible en oxyde de pipéritenone (figure 16). Ce monoterpène est considéré comme un intermédiaire essentiel dans la biosynthèse des monoterpènes de p-menthane oxygénés en C3 chez les espèces de *Mentha* (Kjonaas et Croteau, 1983).

4.2 Observations faites sur *Mentha pulegium*

Les résultats de l'analyse CPG/MS concernant l'HE de cette espèce sont illustrés dans les tableaux 9:

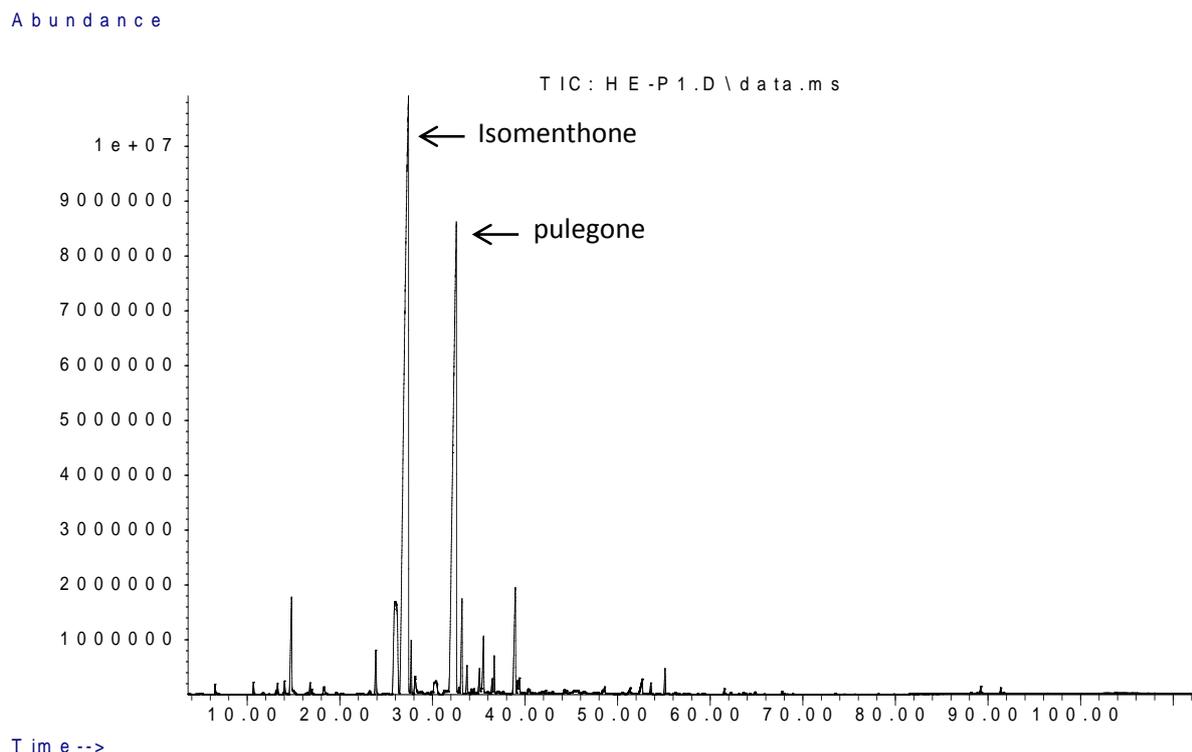


Figure 17 : Tracé chromatographique de l'HE de *M. pulegium* (plante-mère).

L'analyse CPG-MS de l'HE de *M. pulegium* a révélé un total de 29 composés (Figure 17), représentant 94,82% de l'huile totale, principalement dominée par les monoterpènes oxygénés (87,43%), tels que l'**isomenthone** (45,76%) et **pulegone** (29,57%) (Tableau 9).

Selon des précédentes études sur la composition de l'HE de *M. pulegium*, le profil chromatographique est généralement caractérisé par la présence majoritaire d'une seule cétone menthanique, tel que cités auparavant dans des populations du Maroc (pulegone 80,3%), de l'Égypte (pulegone 43,5%), de l'Inde (pulegone 65,9 - 83,1%), de l'Autriche (pipéritone 70,0%) et de la Grèce (pipériténone 83,7 - 97,2%)(**Zwaving et Smith, 1971 ; Kokkini et al., 2002 ; Bouchra et al., 2003, Agnihotri et al., 2005 ; El-Ghorab, 2006**). Toutefois, une étude faite sur une population de *M. pulegium* originaire d'Uruguay a révélé la dominance de deux cétones menthaniques, à savoir le pulegone (73,4%) et l'isomenthone (12,9%) (**Lorenzo et al., 2002**)

Le profil chromatographique de la population objet de notre étude a révélé la dominance de deux monoterpènes l'isomenthone et la pulegone. Ce qui correspond plutôt à la composition décrite pour la population récoltée en Uruguay par **Lorenzo et al. (2002)**.

Notre résultat et le résultat de **Lorenzo** pourraient refléter l'existence d'un chemotype caractérisé par des fortes teneurs en **isomenthone et pulegone**.

Tableau 9 : Composition chimique des HEs de la plante-mère et les *vitro plants* de *M. pulegium*

Composés	RI	Pourcentage (%)					
		Plante-mère	Plantes acclimatées				
			Culture A	Culture B	Culture C	Culture D	Culture E
α -pinene	931	0,19	0,05	0,29	0,11	0,22	0,20
Sabinene	971	0,06	0,12	0,17	0,02	0,36	0,15
β -pinene	974	0,18	0,06	0,19	0,09	0,17	0,16
Octan-3-one	986	0,25	0,11	0,14	0,15	0,13	0,13
Octan-3-ol	998	2,30	1,20	1,07	1,07	0,92	0,94
o-cymene	1023	nd	nd	tr	tr	0,09	0,06
Limonene	1027	0,18	2,69	1,76	0,79	3,38	1,47
1,8-cineole	1029	0,08	0,07	0,06	0,12	0,07	0,08
Octan-3-ol, acetate	1126	0,86	nd	nd	0,08	0,51	0,51
Limonene oxide, <i>cis</i>	1132	nd	0,10	nd	nd	nd	0,04
Limonene oxide, <i>trans</i>	1137	nd	0,08	nd	0,09	nd	nd
L-menthone	1155	6,50	1,11	0,73	26,40	1,02	1,52
Isomenthone	1174	45,76	58,52	47,74	nd	51,98	74,25
Isopulegone	1179	0,80	0,58	0,63	0,98	0,65	0,44
neomenthol	1184	nd	nd	0,11	nd	0,14	nd
(+)-carveol, <i>trans</i>	1226	nd	0,12	nd	0,24	nd	tr
Carveol, <i>cis</i>	1230	nd	nd	0,09	nd	0,14	nd
Pulegone	1248	29,57	25,26	40,88	49,18	32,72	13,96
(1 <i>RS</i> , 4 <i>SR</i>)-8-hydroxy- <i>p</i> -menthane-3-one	1252	0,11	0,03	nd	0,61	nd	nd
Piperitone	1257	1,88	1,44	1,50	0,44	1,98	2,69
5-(1',1'-dimethylethyl)bicycle [3.1.0]hexan-2-one	1285	0,51	0,53	0,23	nd	0,29	nd
8-hydroxy-delta-4(5)- <i>p</i> -menthen-3-one	1291	1,32	1,11	0,52	4,21	0,56	0,34
Carane, <i>trans</i>	1308	0,56	0,11	0,18	nd	nd	0,20
Piperitenone	1343	2,86	nd	1,62	3,48	2,62	0,80
Piperitenone oxide	1365	0,06	0,26	nd	nd	0,06	nd
Mint furanone 1	1495	0,14	nd	nd	0,27	nd	nd
Mint furanone 2	1527	nd	0,10	nd	0,05	0,07	nd
Caryophyllene oxide	1580	0,22	0,14	0,07	0,06	0,08	0,08
Humulene-1,2-epoxide	1607	0,43	0,49	0,27	0,15	0,29	0,30
Monoterpènes		0,69	3,11	2,47	1,37	4,29	2,12
Monoterpenes oxygènes		87,43	87,35	93,1	80,57	91,03	93,7
Sesquiterpenes		0,65	0,63	0,34	0,21	0,37	0,38
Autres		6,05	3,19	2,34	6,44	2,76	2,12

Notes: RI: indice de rétention (abondance normalisée des pics de surface sans facteurs de correction); Culture A (23°C, 16h.lum/8h.obs), Culture B (16°C, 16h.lum/8h.obs), Culture C (35°C, 16h.lum/8h.obs), Culture D (23°C, 16h.obs /8h.lum), Culture E (23°C, obs. totale (étiolement)).

Sur le profil général de la plante-mère et *vitro plants*

- les *vitro plants* de *M. pulegium* (à l'exception de la culture C) ont montré leur capacité à produire les HE avec des profils chromatographiques similaires à celui de la plante-mère (composition dominée par l'isomenthone suivie de la pulegone). Cette similitude de profil chromatographique entre plante-mère et *vitro plants* a été observée aussi chez *Salvia fruticosa* (Arikat *et al.*, 2004).

A l'issu de l'étude de l'effet du stress thermique et lumineux, les remarques suivantes peuvent être émises par rapport aux taux de l'isomenthone, pulegone et menthone (Figure 18) :

Effet de la température

- la diminution de la température de culture de 23°C à 16°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal (16h.lum/8h.obs) a eu pour conséquence une augmentation du taux de la pulegone qui passe de 25,26% (culture A) à 40,88% (culture B) et une diminution du taux de l'isomenthone de 58,52% (culture A) à 47,74% (culture B).
- l'augmentation de la température de culture de 23°C à 35°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal (16h.lum/8h.obs) a eu pour conséquence une augmentation des taux de pulegone et (-)-menthone jusqu'à 49,18% et 26,40% respectivement (culture C), accompagnée d'une absence de l'isomenthone.

Effet de la photopériode

- Le raccourcissement de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (culture D) a eu un impact positif sur le pourcentage de pulegone qui est passé de 25,26% (culture A) à 32,72% (culture D), alors que celui de l'isomenthone a diminué de 58,52% (culture A) à 51,98% (culture D).
- l'obscurité totale (culture E) a eu un impact très significatif sur le taux d'isomenthone qui a sensiblement augmenté à 58,52% par rapport au contrôle (culture A). Dans les mêmes conditions de stress de lumière (obscurité totale), le taux de pulegone a distinctement diminué de 25,26% (culture A) à 13,96% (culture E).

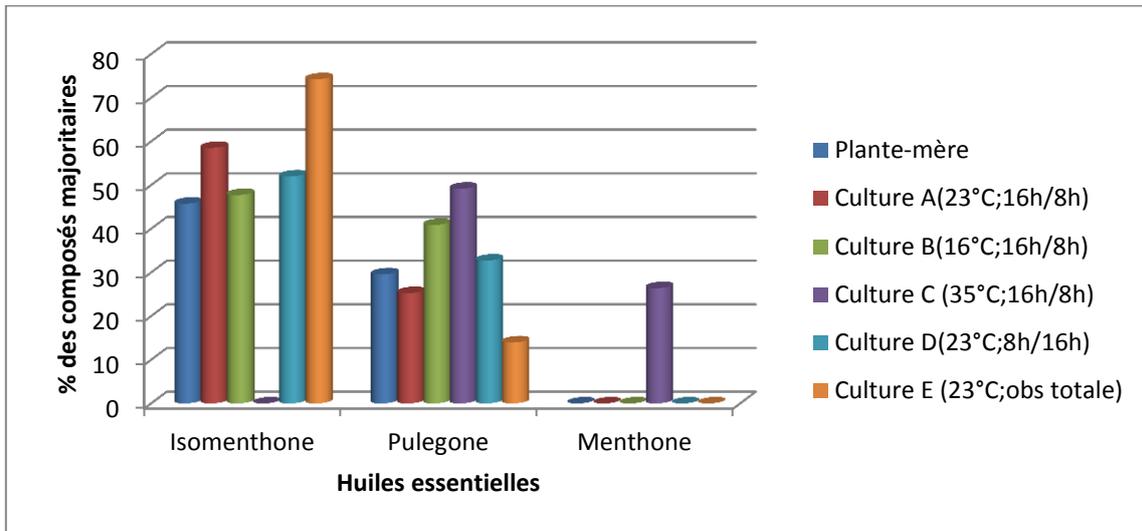
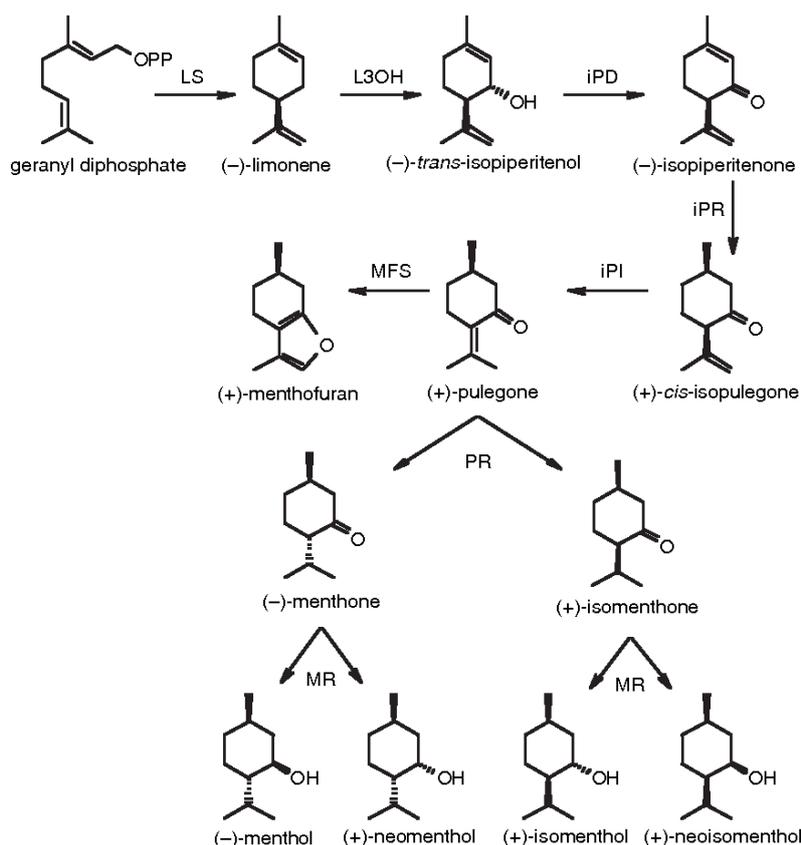


Figure 18: Teneur en % des constituants majoritaires dans les HE accumulés dans les cultures et la plante-mère de *M. pulegium*.

Il est bien connu que le stress thermique ou lumineux peut induire des variations dans la composition des HE (Grahle et Hoeltzel, 1963 ; Hazzit, 2008). Dans notre étude, une conversion entre l'isomenthone et le pulegone a été constatée sous l'effet de la température et la lumière. En effet, les *vitro plants* de *M. pulegium* soumis à l'obscurité totale (culture E) ont vu une conversion de la pulegone vers l'isomenthone. D'autre part, les *vitro plants* soumis à une élévation de la température (culture C) ont vu la transformation de la pulegone vers le (-)-menthone au lieu de l'isomenthone. Ces conversions sont en accord avec les séquences biosynthétiques reportées chez les menthes (Kjonaas et Croteau, 1983) (Figure 19).



LS, (-) - limonène synthase; L3OH, (-) - limonène3-hydroxylase; iPD, (-) - trans-isopipériténol déshydrogénase; iPR, (-) - isopipériténone réductase; iPI, (+) - cis-isopulégone isomérase; PR, (+) - pulegone réductase; MR, (-) - menthone réductase; MFS, (+) - menthofurane synthase.

Figure 19: Biosynthèse du (-) - menthol et des monoterpénoïdes apparentés chez *Mentha*.

L'absence de l'isomenthone dans les cultures C où les *vitro plant* sont soumis à haute température suggère que les enzymes réductrices catalysant la conversion de la pulegone en isomenthone ne s'expriment pas d'une manière optimale dans les plantules. Cette observation est compatible avec d'autres études, où les pousses micropropagées accumulent la pulegone comme constituant principal au lieu du menthone et du menthol (**Burbott et Loomis, 1967 ; Pantak et Heble, 2002**).

Dans le cas de la culture E, le taux élevé d'isomenthone au dépend de la pulegone par rapport à la culture A, peut être expliqué par une conversion optimale de la pulegone vers l'isomenthone par l'enzyme pulegone reductase (**Kjonaas et Croteau, 1983**).

De ces constatations, il peut être suggéré que :

- Une augmentation du taux de l'isomenthone au dépend des autres constituants peut être obtenue en exposant les *vitro plant* à une obscurité totale tout en maintenant une température de 23°C.
- L'élévation du taux de (-)- menthone et l'absence d'isomenthone peut être induite en exposant les *vitro plants* à une température élevée tout en maintenant un cycle de photopériode de 16h lumière/8h obscurité.
- Une diminution du taux de la pulegone (substance hépatotoxique) peut être obtenue en exposant les *vitro plants* à une obscurité totale tout en maintenant une température de 23°C.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

5.1 Observations faites sur les plantes-mères

Les résultats de l'activité antimicrobienne des HE des plantes-mères de *M. rotundifolia* et *M. pulegium* vis-à-vis des 5 souches étudiées sont rapportés dans le tableau 10 et la figure 20.

Tableau 10: Activité antimicrobienne des HE des plantes-mères sur les souches microbiennes.

Huiles essentielles	Souches	Diamètre de la zone d'inhibition*
Plante-mère <i>M. pulegium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,33 ± 5,69b
	<i>Bacillus subtilis</i>	14,67 ± 1,53b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	17,67 ± 2,08b
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	70,00 ± 0,00a
Plante-mère <i>M. rotundifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	17,33 ± 1,15d
	<i>Bacillus subtilis</i>	30,00 ± 2,00bc
	<i>Salmonella enteritidis</i>	24,33 ± 2,08cd
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	34,00 ± 5,29b

* Valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. (n=3).

Valeurs accolées de lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Selon l'échelle précédemment établie, le pouvoir d'inhibition des microorganismes peut être classé comme suit (Tableau 11) :

Tableau 11: Echelle de mesure de l'activité antimicrobienne (Meena et Sethi ,1994 ; Ela *et al.*, 1996)

Diamètres des zones d'inhibitions	Activité antimicrobienne des HE
$\emptyset > 28\text{mm}$	Fortement inhibitrice
$16 < \emptyset < 28\text{mm}$	Modérément inhibitrice
$10 < \emptyset < 16\text{mm}$	Légèrement inhibitrice
$\emptyset < 10\text{mm}$	Non inhibitrice

Selon cette échelle, les HE testées peuvent être considérés comme faiblement à fortement inhibitrices des souches étudiées.

En ce qui concerne les effets spécifiques de chacune des HE vs microorganismes, et en tenant compte de l'échelle précédente, les remarques suivantes peuvent être faites :

- L'HE de la plante-mère *M. pulegium* montre un effet fortement inhibiteur *vis-à-vis* des souches *A. brasiliensis* et *C. albicans*, moyennement inhibiteur sur les souches *S. aureus* et *S. enteritidis*, à faiblement inhibiteur de la souche *B. subtilis*
- L'HE de la plante-mère *M. rotundifolia* montre un effet fortement inhibiteur *vis-à-vis* des souches *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et moyennement inhibiteur de la souche *S. enteritidis* et *S. aureus*.

Selon l'analyse statistique *t-test*, il peut être remarqué que :

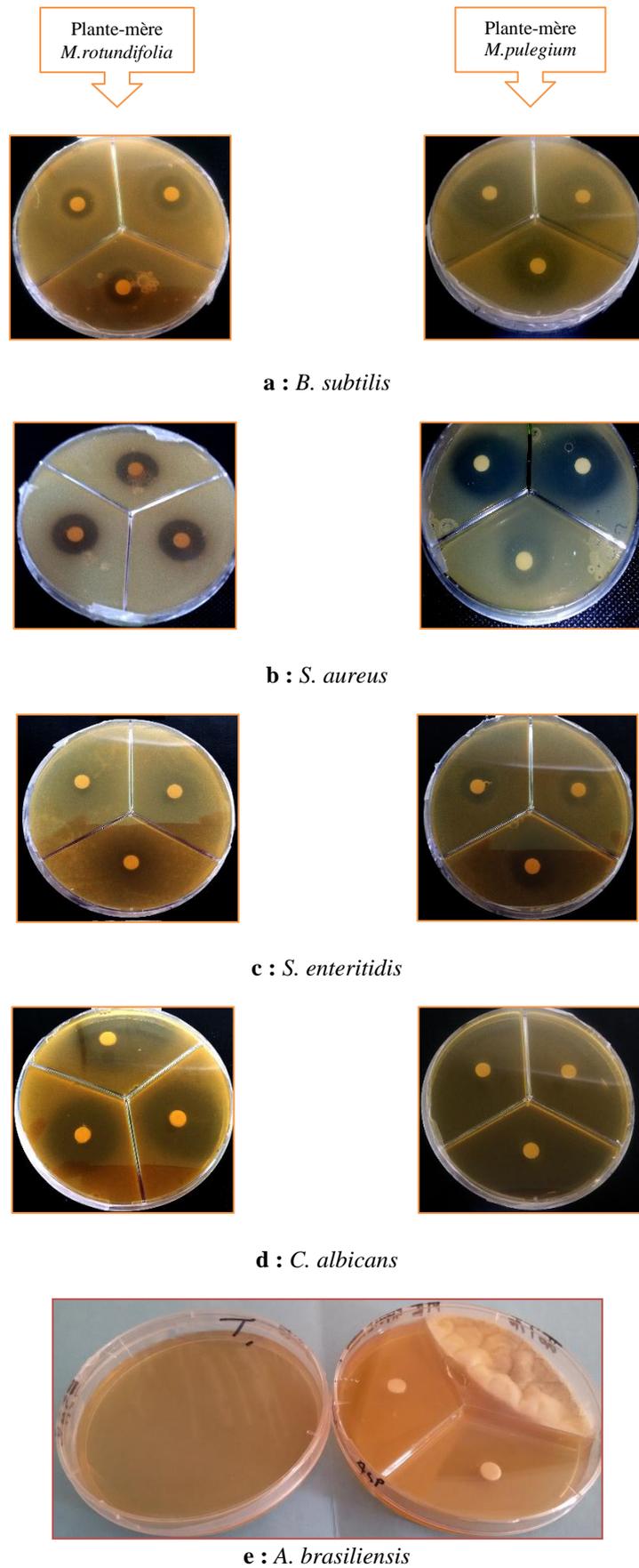
- En ce qui concerne la souche *S. aureus* :
 - Les HE des plantes-mères *M. pulegium* et *M. rotundifolia* exercent un effet inhibiteur modéré sur cette souche mais non statistiquement différent.
- En ce qui concerne la souche *B. subtilis* :
 - L'HE de la plante-mère *M. rotundifolia* exerce un effet fortement inhibiteur statistiquement supérieur à celui exercé par l'HE de la plante-mère *M. pulegium* sur cette souche.
- En ce qui concerne la souche *S. enteritidis*:
 - L'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* exerce un effet moyennement inhibiteur significativement plus important que celui de l'HE de la plante-mère de *M. pulegium* sur cette souche.

➤ En ce qui concerne la souche *A. brasiliensis* :

-Les HE de la plante-mère de *M. pulegium* et *M. rotundifolia* exercent des effets fortement inhibiteurs mais non statistiquement différents sur cette souche.

➤ En ce qui concerne la souche *C. albicans* :

- L' HE de la plante-mère de *M. pulegium* exerce un effet inhibiteur fortement significatif par rapport à celui exercé par l'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* sur cette souche.



a-e : Souches étudiées

Figure 20: Zones d'inhibitions des HE de *M. rotundifolia* et *M. pulegium*

5.2 Effet des conditions de culture sur l'activité antimicrobienne des HE

5.2.1 Observations faites sur les cultures de *Mentha rotundifolia* :

Les résultats de l'effet antimicrobien des HE de *in vitro* plants de *M. rotundifolia* stressés dans différentes conditions *vis-à-vis* des souches étudiées sont rapportés dans le tableau 12 et la figure 22.

Tableau 12: Activité antimicrobienne des HE des cultures stressées de *M. rotundifolia*.

HE	Souches	Diamètre de la zone d'inhibition*
Culture A	<i>Staphylococcus aureus</i>	21,67 ± 0,58c
	<i>Bacillus subtilis</i>	29,33 ± 3,21bc
	<i>Salmonella enteritidis</i>	23,33 ± 3,06c
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	53,33 ± 5,77a
	<i>Candida albicans</i>	35,33 ± 6,43b
Culture B	<i>Staphylococcus aureus</i>	19,67 ± 0,58d
	<i>Bacillus subtilis</i>	39,00 ± 1,73b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	26,00 ± 2,65cd
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	32,67 ± 5,03bc
Culture C	<i>Staphylococcus aureus</i>	22,67 ± 0,58c
	<i>Bacillus subtilis</i>	19,00 ± 1,73c
	<i>Salmonella enteritidis</i>	17,33 ± 1,15c
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	55,33 ± 5,03a
	<i>Candida albicans</i>	32,00 ± 5,29b
Culture D	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,33 ± 0,58c
	<i>Bacillus subtilis</i>	33,33 ± 2,89b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	23,33 ± 3,51c
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	46,00 ± 3,46a
	<i>Candida albicans</i>	31,33 ± 1,15b
Culture E	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,00 ± 3,61c
	<i>Bacillus subtilis</i>	36,33 ± 4,04b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	24,67 ± 0,58c
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	34,00 ± 2,00b

*Valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, (n=3)

Moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Culture A (23°C, 16h.lum/8h.obs), Culture B (16°C, 16h.lum/8h.obs), Culture C (35°C, 16h.lum/8h.obs), Culture D (23°C, 16h.obs /8h.lum), Culture E (23°C, obs. totale (étiolement)).

De la lecture du tableau 12, on peut remarquer que les HE de toutes les cultures de *M. rotundifolia* exercent une activité modérément à fortement inhibitrice sur les souches testées. Selon l'échelle précédemment décrite et concernant l'effet des HE de chaque culture de *M. rotundifolia*, on peut émettre les remarques suivantes :

- L'HE de la culture A (témoin), maintenue à une température de 23°C et un cycle de photopériode de 16h lumière /8h obscurité, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis* et *S. aureus*.
- L'HE de la culture B, maintenue à une température de 16°C et un cycle de photopériode de 16h lumière /8h obscurité, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis* et *S. aureus*.
- L'HE de la culture C, maintenue à une température de 35°C et un cycle de photopériode de 16h lumière /8h obscurité, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis*, *B. subtilis* et *S. aureus*.
- L'HE de la culture D, maintenue à une température de 23°C et un cycle de photopériode de 16h obscurité/8h lumière, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis* et *S. aureus*.
- L'HE de la culture E, maintenue à une température de 23°C et une obscurité totale (étiolement), a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis* et *S. aureus*.

L'analyse statistique *t-test* des effets des HE des cultures stressées (B, C, D et E) de *M. rotundifolia*, comparés à celle de la culture A (témoin), permet d'observer que :

- Les HE des cultures B et D ont un effet inhibiteur significativement inférieur de celle de la culture témoin sur la souche *S. aureus*.
- Les HE des cultures B et C ont un effet inhibiteur significativement supérieur de celle de la culture témoin sur la souche *B. subtilis*.
- Les HE des cultures B et E ont un effet inhibiteur significativement supérieur de celle de la culture témoin sur la souche *A. brasiliensis*.
- Les HE des toutes cultures ont un effet inhibiteur significativement similaire de celle de la culture témoin sur la souche *C. albicans*.
- Les HE des cultures C et E ont un effet inhibiteur significativement inférieur de celle de la culture témoin sur la souche *S. enteritidis*.

En tenant compte de la sensibilité différente des souches microbiennes *vis-à-vis* des HE des cultures de *M. rotundifolia*, une approche statistique utilisant la classification ACP et K-Médoid (logiciel R) a été entreprise (Figure 21)

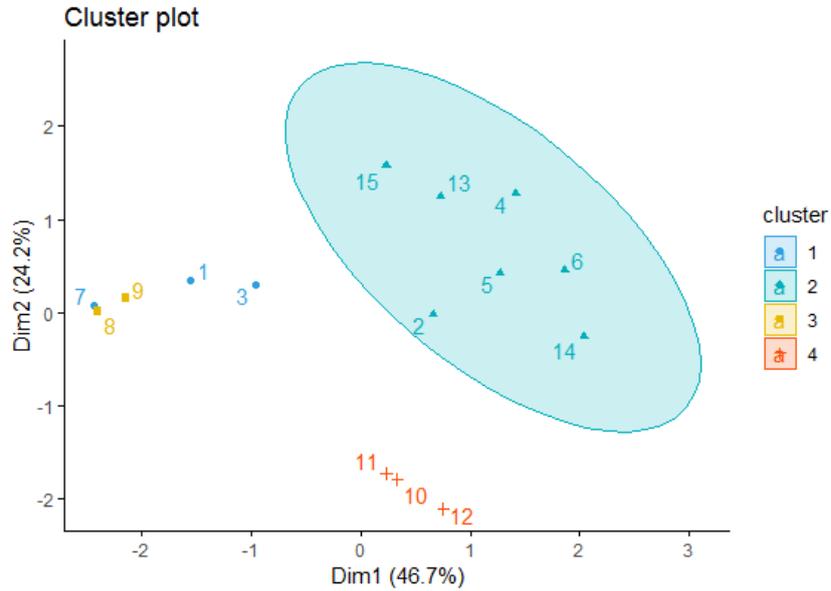
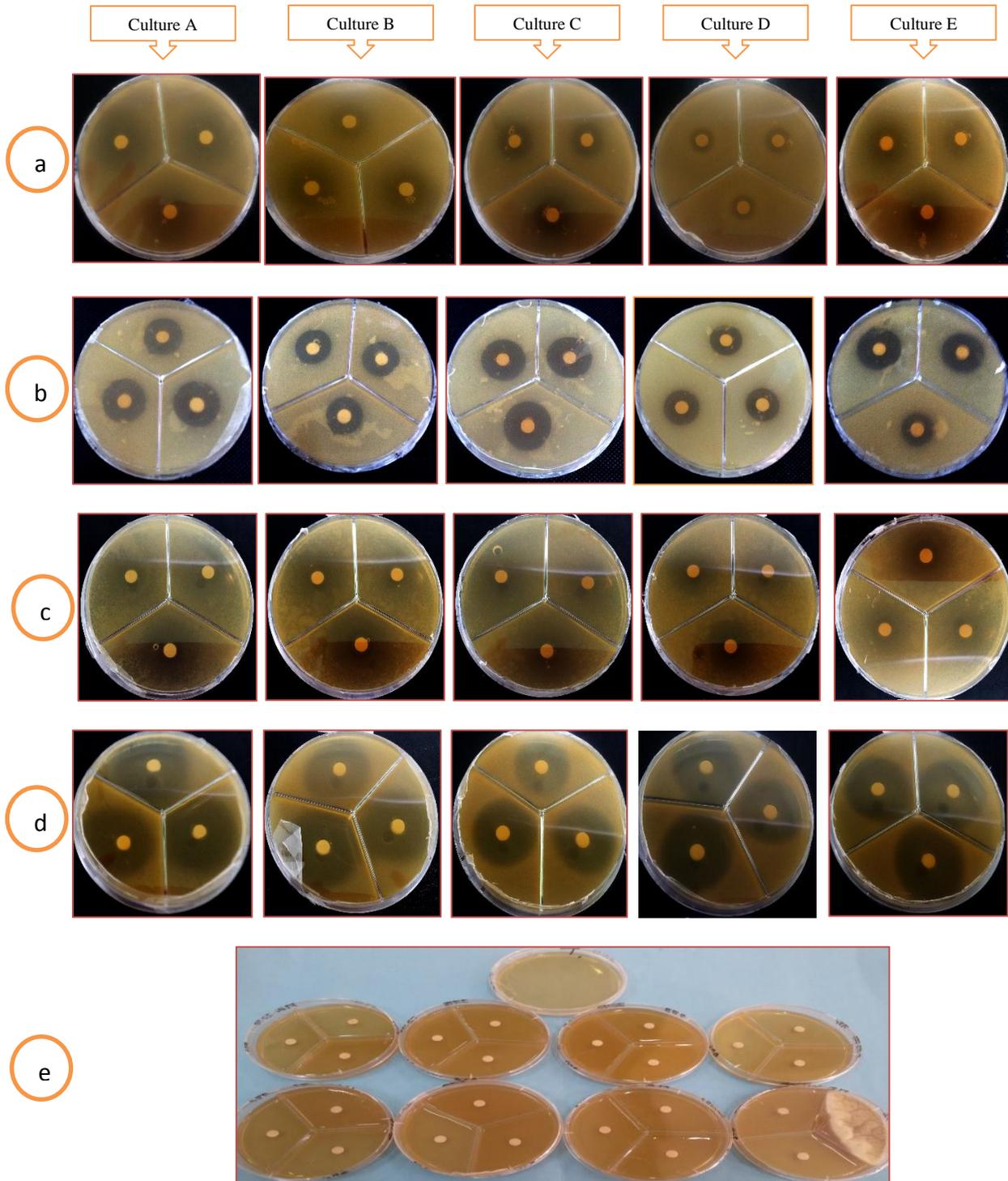


Figure 21: Classification K-Médoid des HE des cultures de *M. rotundifolia*

A l'issue de l'analyse aucune corrélation n'a pu être déduite. Ceci peut être expliqué par les effets antimicrobiens comparables des différents traitements par rapport au contrôle.



Culture A : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture B : *M. rotundifolia* acclimatée à 16°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture C : *M. rotundifolia* acclimatée à 35°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture D : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, 16h obscurité/8h lumière ;
 Culture E : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, obscurité totale (étiolement).

a : *B. subtilis* ; b : *S. aureus* ; c : *S. enteritidis* ; d : *C. albicans* ; e : *A. brasiliensis*

Figure 22: Zones d'inhibition des HE des cultures *M. rotundifolia*

5.2.2 Observations faites sur les cultures de *Mentha pulegium* :

L'estimation de l'activité antimicrobienne des HE des *vitro plants* stressés dans différentes conditions *vis-à-vis* des souches étudiées, est rapportée dans le tableau 13 et la figure 24.

Tableau 13: Activité antimicrobienne des HE des cultures stressées de *M. pulegium*.

HE	Souches	Diamètre de la zone d'inhibition
Culture A	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,67 ± 2,31b
	<i>Bacillus subtilis</i>	22,67 ± 1,15b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	20,33 ± 4,04b
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	53,33 ± 14,47a
	<i>Candida albicans</i>	70,00 ± 0,00a
Culture B	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,00 ± 1,73c
	<i>Bacillus subtilis</i>	17,67 ± 2,52cd
	<i>Salmonella enteritidis</i>	13,67 ± 3,51d
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	26,67 ± 2,31b
Culture C	<i>Staphylococcus aureus</i>	17,33 ± 1,53c
	<i>Bacillus subtilis</i>	15,67 ± 0,58c
	<i>Salmonella enteritidis</i>	25,00 ± 4,36b
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	24,67 ± 1,15b
Culture D	<i>Staphylococcus aureus</i>	18,00 ± 1,73b
	<i>Bacillus subtilis</i>	11,33 ± 2,08b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	13,33 ± 1,15b
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	22,67 ± 11,55b
Culture E	<i>Staphylococcus aureus</i>	19,00 ± 2,65b
	<i>Bacillus subtilis</i>	19,00 ± 1,73b
	<i>Salmonella enteritidis</i>	13,67 ± 0,58b
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70,00 ± 0,00a
	<i>Candida albicans</i>	14,00 ± 8,72b

*Valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, (n=3)

Moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Culture A (23°C, 16h.lum/8h.obs), Culture B (16°C, 16h.lum/8h.obs), Culture C (35°C, 16h.lum/8h.obs), Culture D (23°C, 16h.obs /8h.lum), Culture E (23°C, obs. totale (étiolement)).

Les résultats montrent que les HE de toutes les cultures de *M. pulegium* exercent une activité modérément à fortement inhibitrice vis à vis souches testées.

Selon l'échelle citée par Meena et Sethi (1994) et Ela et al. (1996) :

- L'HE de la culture A, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *B. subtilis* et une action modérément inhibitrice sur *S. enteritidis* et *S.aureus*.

- L'HE de la culture B, maintenue à température de 16°C et un cycle de photopériode de 16h lumière /8h obscurité, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, une action modérément inhibitrice sur *C. albicans*, *B. subtilis* et *S. aureus*, et une action légèrement inhibitrice sur *S. enteritidis*.
- L'HE de la culture C, maintenue à température de 35°C et un cycle de photopériode de 16h lumière /8h obscurité, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, une action modérément inhibitrice sur *C. albicans*, *S. enteritidis* et *S. aureus*, et une action légèrement inhibitrice sur *B. subtilis*.
- L'HE de la culture D, maintenue à température de 23°C et un cycle de photopériode de 16h obscurité/8h lumière, a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, une action modérément inhibitrice sur *C. albicans*, et *S. aureus*, et une action légèrement inhibitrice sur *B. subtilis* et *S. enteritidis*.
- L'HE de la culture E, maintenue à température de 23°C et obscurité totale (étiolement), a une action fortement inhibitrice sur *A. brasiliensis*, une action modérément inhibitrice sur *B. subtilis* et *S. aureus*, et une action légèrement inhibitrice sur *C. albicans* et *S. enteritidis*.

L'analyse statistique *t-test* des effets des HE des cultures stressées (B, C, D et E) de *M. pulegium*, comparés à celle de la culture A (témoin), permet d'observer que :

- Les HE de toutes les cultures ont un effet inhibiteur similaire de celle de la culture A sur les souches *S. aureus* et *A. brasiliensis*
- Les HE des toutes cultures ont un effet inhibiteur inférieur de celle de la culture A sur les souches *B. subtilis* et *C. albicans*.
- L'HE de la culture D possède un effet inhibiteur inférieur différent de celle de la culture A sur la souche *S. enteritidis*.

La classification par ACP et K-Médoid de l'activité antimicrobienne des HE des cultures de *M. pulegium vis-à-vis* des cinq souches testées (Figure 23), montre deux groupes distincts :

- Groupe I, contient la Culture A,
- Groupe II, contient les cultures B, C, D et E.

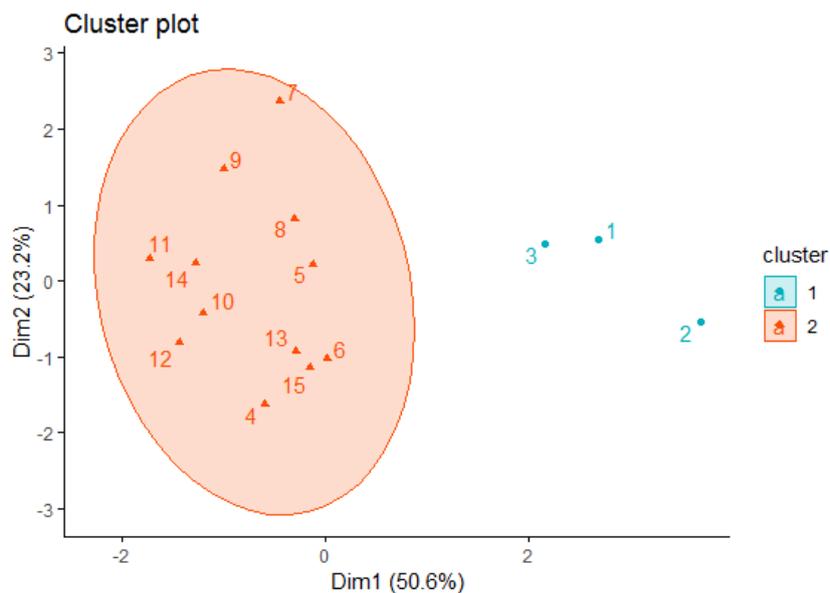
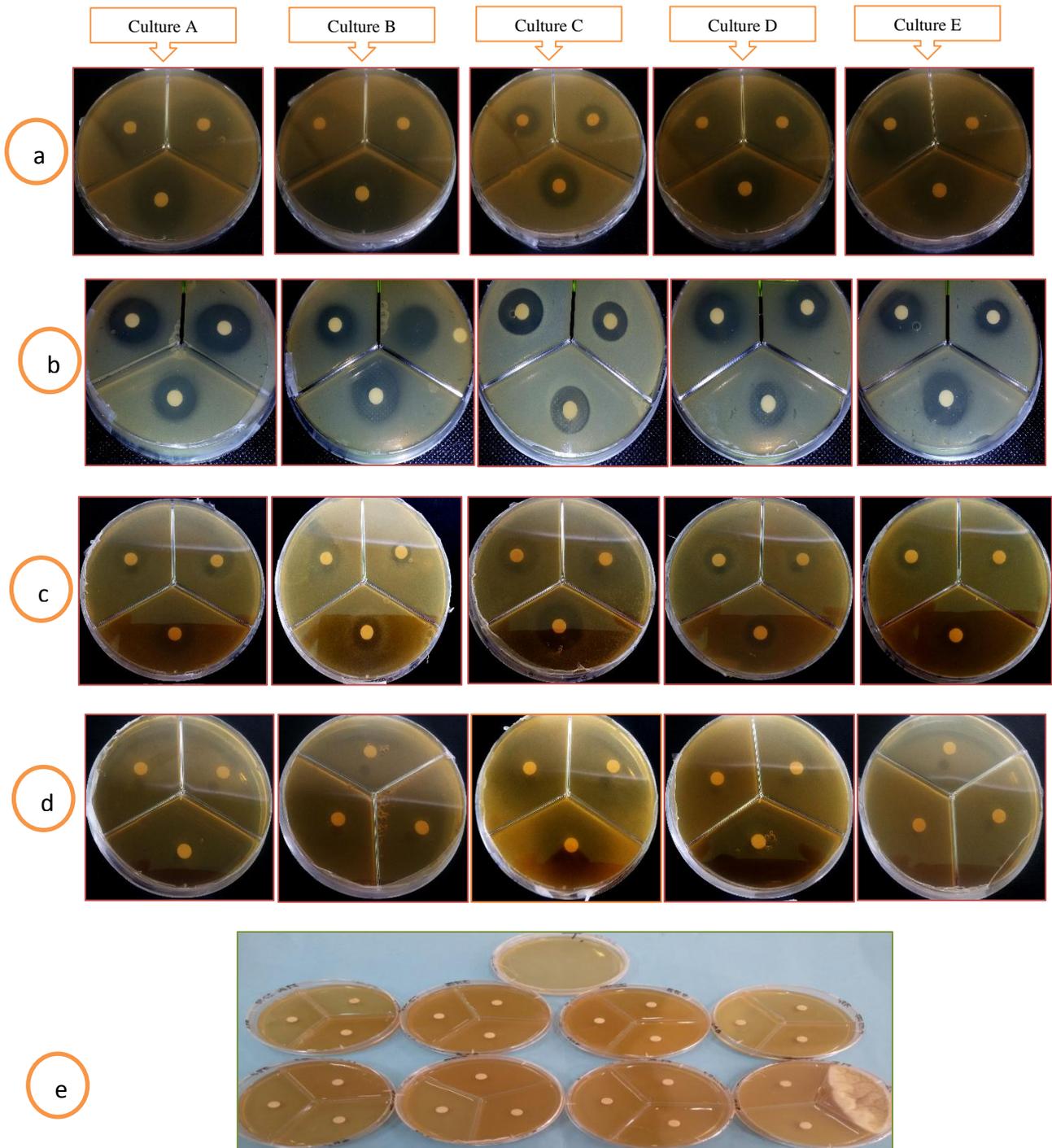


Figure 23: Classification K-Médoid des HE des cultures de *M. pulegium*.

A travers ce traitement, il peut être lu que l'HE de la culture A présente une activité antimicrobienne relativement forte *vis-à-vis* de *C. albicans* ($70,00 \pm 0,00$) et *B. subtilis* ($22,67 \pm 1,15$) en comparaison aux cultures (B, C, D et E).



Culture A : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture B : *M. rotundifolia* acclimatée à 16°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture C : *M. rotundifolia* acclimatée à 35°C, 16h lumière /8h obscurité ;
 Culture D : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, 16h obscurité/8h lumière ;
 Culture E : *M. rotundifolia* acclimatée à 23°C, obscurité totale (étiolement).

a : *B.subtilis* ; b : *S.aureus* ; c : *S. enteritidis* ; d : *C. albicans* ; e : *A. brasiliensis*

Figure 24: Zones d'inhibition des cultures de *M. pulegium*.

A l'issue de l'évaluation des effets des plantes-mères des deux espèces *vis-à-vis* des souches testées, on peut conclure que :

- Les HE des deux plantes-mères ne présentent pas de différences significatives compte à leur effet *vis-à-vis* *S. aureus* et *A. brasiliensis* ;
- L'HE de l'espèce *M. rotundifolia* exerce un effet antimicrobien plus important sur les souches *B. subtilis* et *S. enteritidis*, alors que celle de *M. pulegium* présente un effet plus important sur la souche *C. albicans*.

L'étude de l'effet des conditions d'acclimatation (température et photopériode) montre que :

- Pour l'espèce *M. rotundifolia*,
 - Les HE provenant des cultures soumises à une diminution (culture B) ou élévation de la température (culture C) montrent un effet inhibiteur significativement supérieur à celle de la culture A (témoin) et ceci par rapport à la souche *B. subtilis*.
 - Les HE provenant des cultures soumises à une diminution de la luminosité (culture B) et celles provenant des cultures soumises à une obscurité totale (culture E), montrent un effet inhibiteur significativement supérieur de celle de la culture A (témoin) sur la souche *A. brasiliensis*.
- Pour l'espèce *M. pulegium*,
 - Le stress thermique ou lumineux n'a pas eu un effet positif sur l'activité antimicrobienne des HE provenant des cultures stressés par rapport à la culture témoin, et ceci *vis-à-vis* des 2 souches *B. subtilis* et *C. albicans*.
 - Aucune conclusion ne peut être faite sur l'effet des différents traitements comparés au contrôle et ceci pour les autres souches.

Il est bien établi que les activités biologiques des plantes sont tributaires de leurs compositions chimiques (**Bruneton, 1995**). Dans le cas des HE et l'activité microbienne, la nature chimique des constituants et notamment la présence de groupements fonctionnels peut être un des facteurs le plus déterminant de l'action antimicrobienne (**Hajlaoui et al., 2009 ; Ait-Ouazzou et al., 2012 ; Teixeira et al., 2012 ; Cherrat et al., 2014**).

Les HE des deux espèces de *menthe* étudiée se sont révélées actives contre toutes les souches testées, ce qui est en accord avec des études précédentes faites sur *M. pulegium* et *M. rotundifolia*, où des fortes activités antimicrobiennes ont été signalées (**El arch et al., 2003 ; Mahboubi et haggi, 2008**). Le stress thermique et lumineux est considéré comme un facteur déterminant dans la biosynthèse des métabolites secondaires (**Grahle et Hoeltzel, 1963 ; Hazzit, 2008**). La présence notable de la pulegone et de l'oxyde de piperitenone dans les cultures de *M. pulegium* et *M. rotundifolia*, respectivement, peut être associée à l'activité antimicrobienne. En effet, ces monoterpènes sont connues pour exercer des effets fongicides et antibactériens puissants (**Iscan et al., 2002 ; Oumzil et al., 2002 ; El arch et al., 2003 ; Ladjel et al., 2011 ; Ait ouazzou, 2012 ; De sousa Barros, 2015**). Nos deux plantes montrent des HE riche en monoterpènes oxygénés avec des valeurs de 87,43% ; 81,28% pour *M. pulegium* et *M. rotundifolia*, respectivement. Cette fraction de monoterpènes est décrite très actives *vis-à-vis* des souches microbiennes (**Carson et Riley, 1995**).

6. Evaluation de l'activité antioxydante des HE

Les résultats de l'activité antioxydante des HE estimée par le pouvoir du piégeage des radicaux libres DPPH, ABTS et CUPRAC sont illustrés dans le tableau 14. BHA a été utilisé comme témoin positif. Les tests ont été effectués à différentes concentrations (10mg/mL à 0,156mg/mL) pour déduire les valeurs IC₅₀ et A_{0,50}.

Tableau 14: Activité antioxydante des HE *vis à vis* du radical DPPH, ABTS et CUPRAC.

Huiles essentielles		Activité antioxydante ^a		
		DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS IC ₅₀ (mg/mL)	CUPRAC A _{0,50} (mg/mL)
<i>M. rotundifolia</i>	Plante-mère	10,35 ± 0,58	0,12 ± 0,09	0,99 ± 0,03
	Culture A	4,75 ± 0,31	0,51 ± 0,02	1,80 ± 0,34
	Culture B	4,18 ± 0,29	1,53 ± 0,18	1,81 ± 0,14
	Culture C	24,93 ± 8,80	0,92 ± 0,43	1,21 ± 0,06
	Culture D	9,19 ± 0,18	1,56 ± 0,14	2,71 ± 0,08
	Culture E	7,44 ± 0,19	0,85 ± 0,12	0,34 ± 0,15
<i>M. pulegium</i>	Plante-mère	22,93 ± 6,58	1,97 ± 0,26	2,18 ± 0,15
	Culture A	30,88 ± 7,54	1,94 ± 0,06	1,67 ± 6,84
	Culture B	29,28 ± 18,14	5,33 ± 1,59	3,66 ± 0,59
	Culture C	11,99 ± 0,43	0,19 ± 0,33	1,33 ± 0,38
	Culture D	21,52 ± 0,51	2,09 ± 0,19	3,64 ± 0,74
	Culture E	51,97 ± 32,73	6,45 ± 1,63	4,64 ± 0,20
Antioxydant témoin	BHA ^b	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,008 ± 0,0004

^a Valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type, n=3.

^b BHA-Radical Hydroxyanisole butylé.

A travers la lecture des résultats, il peut être observé que les HE des plantes-mères et des *vitro plants* montrent un effet antioxydant sur les trois tests effectués (DPPH, ABTS et CUPRAC). Cet effet reste toutefois significativement faible par rapport à celui du BHA. Exception est faite pour l'action anti-ABTS de l'HE de la plante-mère *M. rotundifolia* vs BHA où les effets étaient non significativement différents.

En ce qui concerne le test DPPH, il peut être remarqué que :

Pour *M. rotundifolia* vs *M. pulegium*

- L'effet anti-radicalaire exercé par l'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* est significativement supérieur à celui de la plante-mère de *M. pulegium*.

Pour *M. rotundifolia* : plante-mère vs *vitro plants*

- L'HE de la plante-mère exerce une activité antioxydante significativement plus faible que celle des *vitro plants* non stressés (Culture A).

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (culture A) (Figure 25).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) provoque une augmentation non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture contrôle (culture A). Alors qu'une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une diminution non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D) ainsi qu'une obscurité totale (Culture E), induisent une augmentation significative des potentiels antioxydants par rapport à la culture A.

Pour *M. pulegium* : plante-mère vs *vitro plants*

- L'HE de la plante-mère exerce une activité antioxydante significativement plus importante que celle des *vitro plants* non stressé (Culture A).

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (Figure 26).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) donne un potentiel antioxydant faible non significativement différent à celui de la culture A. Par contre, une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une augmentation significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D) ainsi qu'une obscurité totale (Culture E), induisent des différences non significative des potentiels antioxydants par rapport à la culture A.

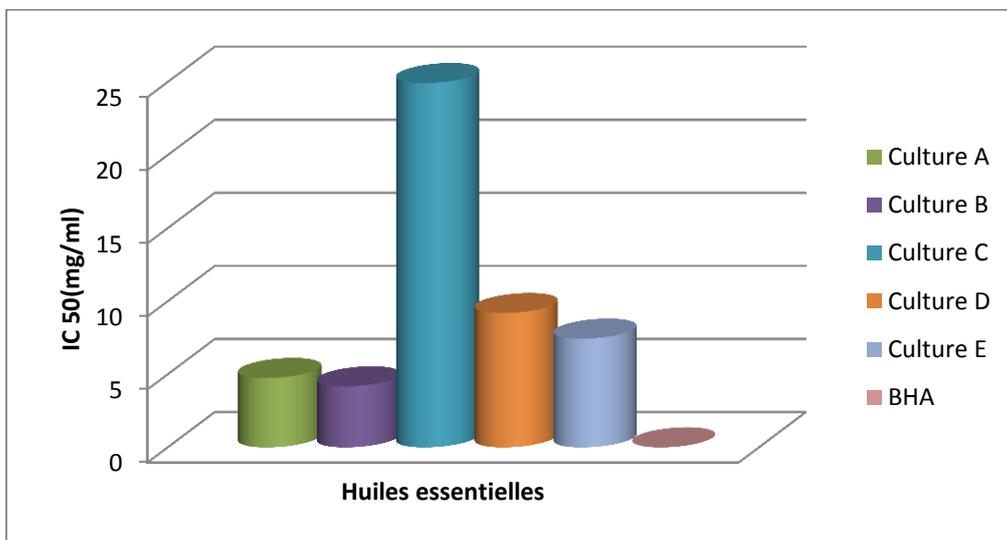


Figure 25: IC₅₀ des HE des cultures de *M. rotundifolia* pour le test DPPH.

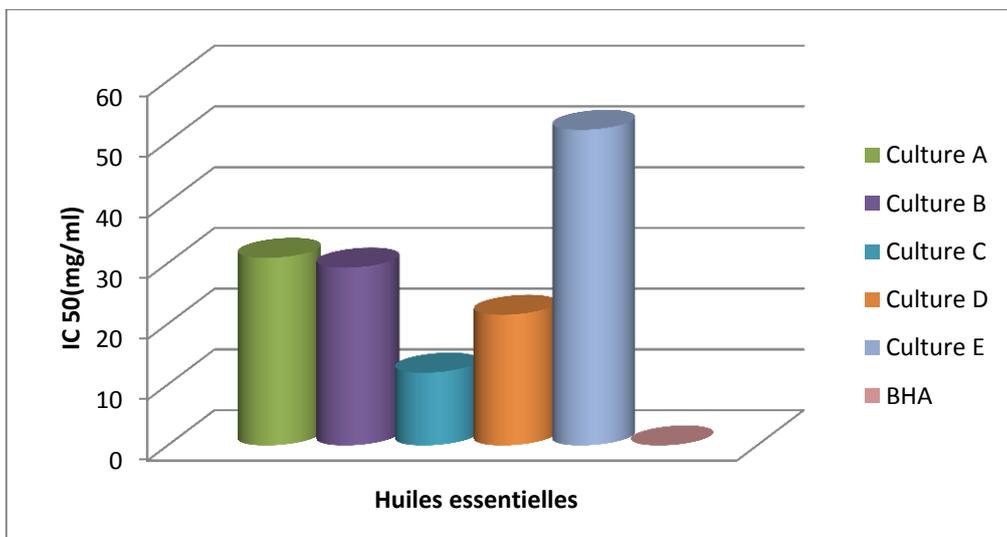


Figure 26: IC₅₀ des HE des cultures de *M. pulegium* pour le test DPPH.

En ce qui concerne le test ABTS (Tableau 14), les résultats obtenus révèlent que :

➤ Pour *M. rotundifolia* vs *M. pulegium*

L'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* possède un potentiel antioxydant significativement supérieur à celui de l'HE de *M. pulegium*. Comme il a été soulevé avant, le BHA a montré une activité anti-radicalaire significativement supérieure par rapport à celle de l'HE de la plante-mère de *M. pulegium*, mais non significativement différente à celle de l'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia*.

➤ Dans le cas de *M. rotundifolia* : plante-mère vs *vitro plants*

- Une diminution significative de l'activité antioxydante a été enregistrée chez les *vitro plants* (Culture A) par rapport à celle de la plante-mère.

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (Figure 27).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) provoque une diminution significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- Une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une diminution non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D) ainsi qu'une obscurité totale (Culture E), induisent une diminution significative des potentiels antioxydants par rapport à la culture A.

➤ Dans le cas de *M. pulegium* : plante-mère vs *vitro plants*

- Une augmentation non significative de l'activité antioxydante a été enregistrée chez les *vitro plants* (Culture A) par rapport à celle de la plante-mère.

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (Figure 28).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) induit une diminution non significatif du potentiel antioxydant par rapport à celui de la culture A.
- Une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une augmentation significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D), induit une diminution non significative du potentiel antioxydant par rapport à celui de la culture A.
- Les *vitro plants* soumis à obscurité totale (Culture E), présentent un potentiel antioxydant significativement faible par rapport à la culture A.

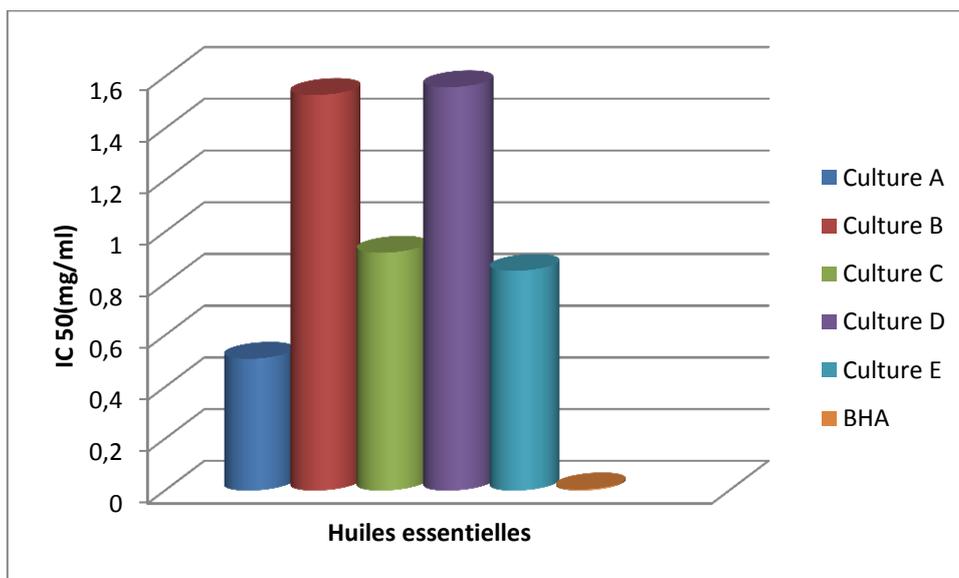


Figure 27: IC₅₀ des HE des cultures de *M. rotundifolia* pour le test ABTS.

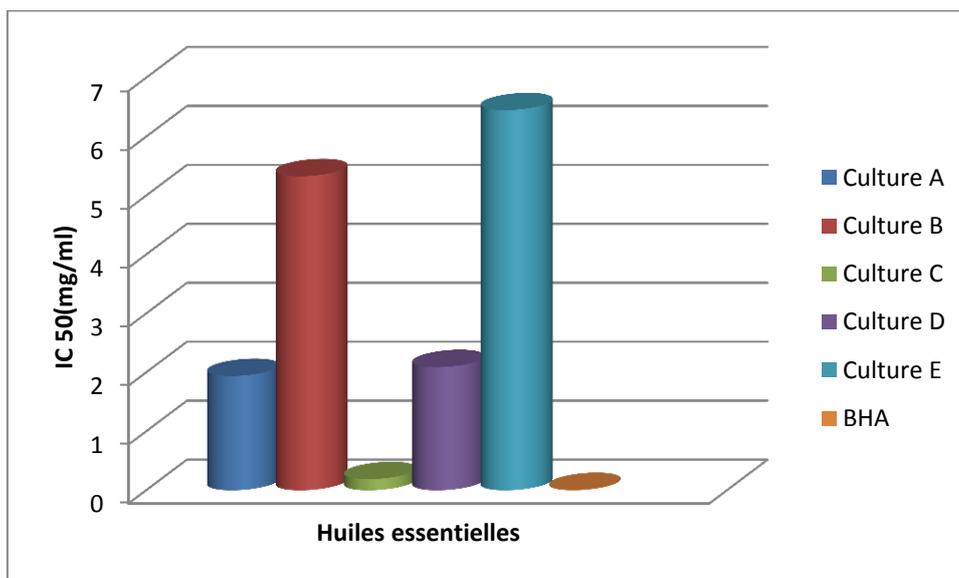


Figure 28: IC₅₀ des HE cultures de *M. pulegium* pour le test ABTS.

En ce qui concerne le test CUPRAC, on peut remarquer que :

➤ Pour *M. rotundifolia* vs *M. pulegium*

L'HE de la plante-mère de *M. rotundifolia* possède un potentiel antioxydant significativement supérieur à celui enregistré pour l'HE de la plante-mère de *M. pulegium*. L'antioxydant de synthèse (BHA) a montré une activité anti-radicalaire significativement supérieure par rapport à ceux des HE des deux espèces.

➤ Dans le cas de *M. rotundifolia* : plante-mère vs *vitro plants*

- Une diminution significative de l'activité antioxydante a été enregistrée chez les *vitro plants* (Culture A) par rapport à celle de la plante-mère.

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (Figure 29).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) provoque une diminution non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- Une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une diminution significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D), induit une diminution significative de potentiel antioxydant par rapport à celui de l'HE de la culture A.
- L'obscurité totale (Culture E), induit une augmentation significative de potentiel antioxydant par rapport à celui de l'HE de la culture A.

➤ Dans le cas de *M. pulegium* : plante-mère vs *vitro plants*

- Une augmentation non significative de l'activité antioxydante a été enregistrée chez les *vitro plants* (Culture A) par rapport à celle de la plante-mère.

Le stress thermique et lumineux a eu un impact sur l'activité antioxydante des *vitro plants* stressés par rapport à celle du contrôle (Figure 30).

- Une diminution de la température de culture des *vitro plants* de 23°C à 16°C (Culture B) provoque une diminution non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- Une augmentation de la température de culture des *vitro plants* jusqu'à 35°C (Culture C) provoque une augmentation non significative du potentiel antioxydant des HE par rapport à la culture A.
- La diminution de la durée d'exposition des *vitro plants* à la lumière (Culture D), induit une diminution non significative de potentiel antioxydant par rapport à celui de l'HE de la culture A.
- L'obscurité totale (Culture E), induit une diminution non significative de potentiel antioxydant par rapport à celui de l'HE de la culture A.

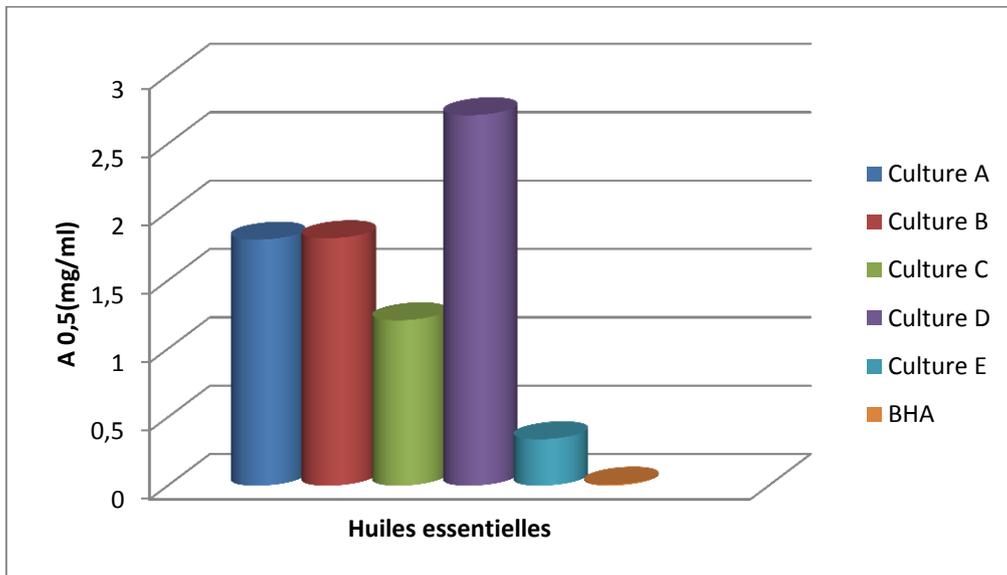


Figure 29: A_{0,5} des HE des cultures de *M. rotundifolia* pour le test CUPRAC.

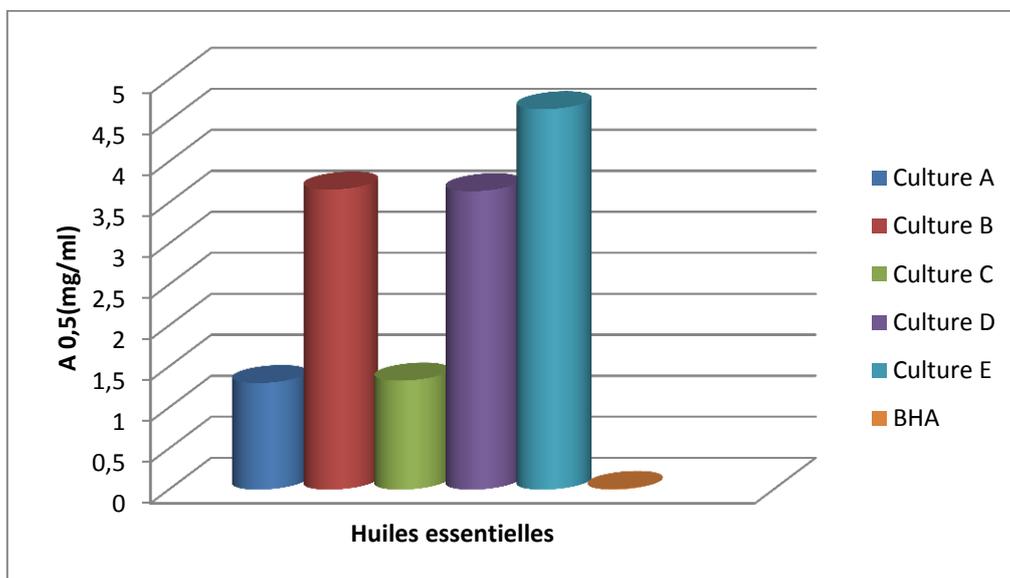


Figure 30: A_{0,5} des HE des cultures de *M. pulegium* pour le test CUPRAC.

Globalement, les HE des plantes-mères ont présenté une activité antioxydante mais qui reste inférieur à celle produite par l'antioxydant de synthèse (BHA). Cette constatation est partagée par plusieurs études faites sur les deux espèces (**Cherrat *et al.*, 2014 ; Ferjioui, 2014**).

A l'issue de l'effet du stress thermique et lumineux sur l'activité antioxydante, on peut remarquer que :

➤ Pour *M. pulegium*

Une augmentation significative du pouvoir antioxydant des HE a été obtenue, sur tous les tests (DPPH, ABTS et CUPRAC), dans les cultures soumises à une température de 35°C tout en maintenant un cycle de photopériode de 16h de lumière /8h d'obscurité (Culture C). Cette augmentation du potentiel antioxydant des HE peut être corrélée à la forte teneur de la pulegone dans ces cultures. Ce monoterpène possède des propriétés antioxydantes puissantes mesurées par rapport au test TBARS (substances réactives à l'acide Thio barbiturique) (**Ruberto et Baratta, 2000**).

➤ Pour *M. rotundifolia*,

Les cultures maintenues dans une obscurité totale tout en maintenant une température de 23°C (culture E), ainsi que celles soumises à une réduction du temps d'exposition à la lumière (culture D), ont vu leur pouvoir antioxydant augmenté sur les deux tests (DPPH et CUPRAC) et sur le test DPPH, respectivement par rapport à la culture témoin.

Ce changement peut être dû à la présence notable dans ces cultures de l'oxyde de piperitenone. Ce dernier présente dans sa structure les fragments hydrogènesallilique et α -carbonylique qui lui confèrent une capacité antiradicalaire particulière (**Ghoulami *et al.*, 2001**).

L'activité antioxydante des HE pourrait être attribuée à leur composition chimique, notamment par la présence de substances capables de piéger les radicaux libres oxygénés (**Burt, 2004 ; Barra *et al.*, 2010, Derwich *et al.*, 2011**). La présence de fortes teneurs en pulegone et en oxyde de piperitenone dans *M. pulegium* et *M. rotundifolia*, respectivement peut être associée à l'activité antioxydante. Ces monoterpènes oxygénés sont responsables des propriétés antioxydantes importantes comme précédemment rapportés (**Miladi *et al.*, 2013**).

Conclusion générale

La micropropagation peut être utilisée pour la multiplication à grande échelle de plantes productrices d'HE, qui pourraient présenter un intérêt de la part des industriels du secteur agroalimentaire de par leur pouvoir antioxydant et antimicrobien.

Cette étude a concerné deux espèces de labiées commune en Algérie, à savoir *Mentha rotundifolia* et *Mentha pulegium* avec comme double objectif :

- d'une part déterminer les conditions optimales pour la culture et la régénération des deux espèces, et ;
- d'autre part évaluer l'effet du stress thermique et lumineux sur le rendement, la composition quantitative et qualitative des HE, ainsi que sur leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Sur le plan de la micropropagation des 2 espèces, l'induction des *vitro plants* a été achevée avec succès par culture de fragment nodal sur milieu Murashige et Skoog (MS) additionné de 1 mg/L BAP + 1 mg/L GA3. La multiplication a été réalisée sur milieu MS additionné de 0,5 mg/L BAP + de 0,5 mg/L GA3 pour *M. rotundifolia* et additionné de 0.5 mg/L BAP + 1 mg/L GA3 pour *M. pulegium*. Les deux espèces de Menthe enracinées *in vitro* ont été bien acclimatées avec un taux de survie total supérieur à 96%.

Sur l'aspect rendement en HE, l'effet du stress thermique et lumineux effectués sur les *vitro plants* des deux espèces montrent qu'une augmentation de la température de culture à 35°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal (16h de lumière/8h d'obscurité), ainsi qu'une réduction du temps d'exposition à la lumière tout en maintenant une température de 23°C, conduisent à des augmentations significatives des rendements en HE par rapport aux *vitro plants* témoins.

Sur le volet composition des HE, les *vitro plants* des 2 espèces de menthe, maintenus dans des conditions non stressées de culture, ont montré leur capacité de reproduire des profils chromatographiques plus ou moins similaire à la plante-mère correspondante.

Dans les conditions de stress, il a été constaté ce qui suit:

➤ Pour les *vitro plants* de *M. rotundifolia* :

Une diminution de la température dans les cultures de 23°C à 16°C a induit le plus fort taux en oxyde de piperitenone. Le même effet sur cette molécule a été observé quand les cultures ont été soumises à moindre luminosité. De même, l'élévation de la température dans les cultures de 23°C à 35°C a conduit à un rendement 2 fois plus élevé en HE et un taux six fois plus élevé en limonene par rapport à la culture témoin.

➤ Pour les *vitro plants* de *M. pulegium* :

Une élévation de la température dans les cultures de 23°C à 35°C a doublé le rendement en HE et a provoqué une absence de l'isomenthone avec une augmentation de la menthone estimée à 4 fois plus que celle de la culture témoin.

L'obscurité totale a impacté négativement la teneur en pulegone, où le taux a été presque divisé par deux, et elle a eu aussi pour conséquence une augmentation significative du taux d'isomenthone par rapport à la culture témoin.

Les effets du stress thermique et lumineux sur les activités biologiques, ont montré que :

Pour l'activité antioxydante

- Une obscurité totale tout en maintenant une température de 23°C ainsi qu'une diminution de la température à 16°C tout en maintenant un cycle de photopériode normale, ont induit une augmentation significative du pouvoir antioxydant des HE des *vitro plants* de *M. rotundifolia*.
- Une augmentation de la température de 35°C tout en maintenant un cycle de photopériode normal engendre aussi une augmentation significative du pouvoir antioxydant des HE des *vitro plants* de *M. pulegium*.

Pour l'activité antimicrobienne

➤ En ce qui concerne *M. rotundifolia* ;

- Une diminution de la température ou son augmentation dans les conditions normales de photopériode provoquent un effet inhibiteur des HE significativement supérieur par rapport à la culture témoin sur la souche *B. subtilis*.

- De même, une diminution de la température ainsi qu'une obscurité totale dans les cultures ont conduit à un effet inhibiteur des HE significativement supérieur à celui de la culture témoin sur la souche *A. brasiliensis*.
- En ce qui concerne les souches *S. aureus*, *S. enteritidis* et *C. albicans*, le stress thermique et lumineux n'a pas induit à une différence significative quant à l'activité antimicrobienne des HE par rapport à celle de la culture témoin.
- En ce qui concerne *M. pulegium* ;
 - Le stress thermique et lumineux a un effet négatif sur l'activité antimicrobienne des HE des *vitro plant* de *M. pulegium*, où on a constaté que l'effet de ces derniers a sensiblement baissé sur toutes les souches par rapport à la culture non stressé.

L'HE de *M. pulegium* avec une forte abondance du (-)-menthone et une teneur faible en pulegone (hépatotoxique) présenterait un intérêt commercial évident. Au même titre, l'HE de *M. rotundifolia* riche en oxyde de pipéritenone constituerait un produit à fort potentiel économique dans l'industrie agroalimentaire.

Notre travail a montré que :

- Les *vitro plants* de *M. pulegium* soumis à une température élevée (35°C) tout en maintenant un cycle de photopériode de 16h lumière/8h obscurité présentent un taux important en (-)- menthone. De même un stress lumineux a provoqué une diminution sensible du taux de pulegone (substance indésirable). Une voie intéressante à prospecter est de soumettre les *vitro plants* en même temps à un stress d'une température élevée et d'une obscurité totale pour évaluer l'incidence sur la teneur des deux monoterpènes.
- Les *vitro plants* de *M. rotundifolia* soumis à une diminution de la température ou à une diminution de la durée d'exposition à la lumière présentent des taux élevés d'oxyde de pipéritenone. Une voie intéressante à prospecter est de soumettre les *vitro plants* en même temps à un stress d'une température basse et à un raccourcissement de la durée d'exposition à la lumière pour évaluer l'incidence sur la teneur du monoterpène cétonique.

Finalement, ce travail a présenté un protocole efficace de la micropropagation *in vitro* par culture des bourgeons axillaires du genre *Mentha*. Ce dernier assure l'établissement des cultures, leur multiplication, la rhizogénèse et l'acclimatation des *vitro plants* de Menthe. Aucune difficulté majeure n'a été rencontrée, les explants utilisés répondent bien au stimulus hormonaux exogènes appliqués. Ils ont même montré un rythme de croissance important ainsi qu'une capacité d'enracinement importante. La régénération sans passage par le stade cal est essentielle pour mettre au point un protocole de micropropagation efficace qui assure la fidélité génétique entre les boutures.

En ce qui concerne la production des HE, les manipulations faites sur la lumière et la température ont montré qu'il est possible d'augmenter significativement leur rendement et orienter préférentiellement leur biosynthèse par rapport aux composés à forte valeur ajoutée (menthone, oxyde de piperitenone) ou par rapport aux molécules à effet indésirable (pulegone hépatotoxique).

Ce travail a montré que les deux paramètres abiotiques (température et lumière) impactent positivement l'activité antioxydante des HE produites dans les cultures alors, que leur effets sur l'activité antimicrobienne est moins évident.

Bien que la température et la lumière constituent des facteurs importants, d'autres paramètres tels que le stress hydrique, la salinité, la composition du sol et celle du milieu de culture notamment la composition hormonale, devraient également être explorés pour optimiser la culture des *vitro plants* des 2 espèces pour la production des HE en terme de rendement plus important et de composition.

A ce jour, les deux HE objet de notre étude présentent peu d'applications dans les domaines de la pharmacie, agroalimentaire et cosmétique. Les raisons du peu d'intérêt de la part des industriels envers ces produits résident selon notre point de vue sur les points suivant :

- Approvisionnement essentiellement provenant des plantes sauvages
- Matière première présente une variabilité importante en termes de qualité.
- Absence de spécifications
- Méconnaissance des effets bio-pharmacologiques et délétères

La valorisation des HE de ces espèces doit forcément passer par l'étude de ces aspects.

Références bibliographiques

Adams R. P., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Aflatuni A., 2005. The yield and essential oil content of mint (*Mentha ssp.*) in Northern Ostrobothnia. Faculty of Science, University of Oulu, Department of Biology, Finland.

AFNOR, 2000. Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.

Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A., and Pourmortazavi S., 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil, *Talanta*, 62: 407-411.

Agnihotri V., Agarwal S., Dhar P., Thappa R., Kapahi B., Saxena R., and Qazi G., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* growing wild in the north-western Himalayas India., *Flavour Fragr*, 20: 607-610.

Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R., Conchello P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res Inter.*, 45: 313-319.

Allard H.A., 1941. Further studies of the photoperiodic behaviour of some mints (Labiatae). *J. Agric. Res.*, 63: 55-64.

Alonso W.R., Rajaonarivony J.I.M., Gershenzon J., Croteau R., 1992. Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha × piperita*) and spearmint (*M. spicata*). *J Biol Chem.*, 267: 7582–7587.

Ammirato P.V., 1983. Embryogenesis. In: Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada J., editors. *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1. New York: MacMillan.

Ansari A., Znini M., Laghchimi A., Costa J., Ponthiaux P., and Majidi L., 2015. Chemical composition, adsorption properties and corrosion inhibition on mild steel of

Mentha rotundifolia L. essential oil from Morocco, *Sch. Res. Libr. Pharm. Lett.*, 7(6): 125-140.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.*, 52:7970-7981.

Arafeh R.M., 1999. Factors affecting *in vitro* propagation, callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in sweet marjoram *Origanum vulgare* L. and Syrian marjoram *majoran syriaca* L. Rafin (*origanum syriacum* L.). M.Sci.Thesis. Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan.

Ariket N.A., Jawad F.M., Karam N.S., Shibli R.A., 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Sativa fruticosa* Mill). *Sci. Hort.*, 100: 193-202.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris.

Arvy M.P., Gallouin F., 2003. Épices, aromates et condiments, Belin. Edition Quæ, Versailles Cedex, France.

Avato P., Sgarra G., Casadoro G., 1995. Chemical composition of the essential oils of *Mentha* species cultivated in Italy. *Sci. Pharm*, 63: 223-230.

Bajaj Y.P.S., Furmanowa M., Olszowska O., 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS, editor. Biotechnology in Agriculture and Forestry, New York: Springer Verlag, 4: 60-103.

Baris O., Gulluce M., Shain F., Ozer H., Kilic H., Ozkan H., Sokmen M. and Ozber T., 2006. *Turkish Journal of Biology*, 30:65-73.

Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P., Angioni A., 2010. Chemical variability, antifungal and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil from Sardinia.

Nat. Prod. Commun, 5: 329-335.

Başer K., Kürkcüoğlu M., Tarimicilar G., and Kaynak G., 1999. Essential oils of *Mentha* species from northern Turkey. *J. Essent. Oil*, 11: 579-588.

Beghidja N., Bouslimani N., Benayache F., Benayache S., and Chalchat J. C., 2007. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the east of Algeria, *Chem. Nat. Compd.*, 43 (4): 481–4830.

Belaiche, P., 1979. L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. *M. S. A. Editeur*, Paris. Tome 1, 204.

Benayad N., Ebrahim W., Hakiki A., and Mosaddak M., 2012. Chemical characterization and insecticidal evaluation of the essential oil of *Mentha suaveolens* L. and *Mentha pulegium* L. growing in Morocco, *Sci. Study Res. Chem. Chem. Eng. Biotechnol. Food Ind.*, 13(1): 27-32.

Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988. Extraction des huiles essentielles : *Chimie et technologie. Information chimie*, 298 : 179-184.

Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers.Fr. *Phytochemistry*, 89: 165-69.

Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J., 2006. *Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09- 12 Mai 2006.

Boukhebti H., Chaker A. N., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M. R., Laouer H., et al., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils, *Pharm. Lett.*, 3(4): 267-275.

Bousbia N., 2004. Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle,

Coriandre, Origan, Thym, Romarin) Etude de leurs activités antimicrobiennes. Th. Magister. INA. Alger, 15P.

Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G., 2006. Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) From Algeria, *J. Essent. Oil Res.*, 18(6): 663-665.

Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G., 2007. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 11(1): 3-7.

Brand W., Cuvelier W., Berset M.E., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft technology*, 28: 25-30.

Bruneton J., 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publ. Londres, New York, Paris, 405–466.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. *Lavoisier, Tech. et doc.*, 3ème Ed., Paris.

Buchbauer G., 2000. *Perfumer & Flavorist*, 25: 64-67. In GC/MS Analysis of Volatile Compounds of the Essential Oil of the Leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco. Derwich E., Benziane Z and Taouil R., Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara), 55(69): 2.

Burbott A.J., Loomis W.D., 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiol.*, 42: 20-28.

Burke C.C, Wildung M.R, Croteau R., 1999. Geranyl diphosphatesynthase: cloning expression and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 13062-13067.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol*, 94: 223-253.

Calvo M.C. & Sanchez-Gras M.C., 1993. Accumulation of monoterpenes in shoot-proliferation cultures of *Lavandula latifolia*. *Medical Plant Science*, 91: 207-212.

Calvo, M.C., Segura, J. 1989. *In vitro* propagation of lavender. – *HortScience*, 24: 375-376.

Carson C.F., Riley T.V., 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 264-269.

Chaari-rkhis A., Maalej M., Drira N., 2008. Utilisation de la micropropagation par bourgeonnement axillaire pour la multiplication des variétés tunisiennes d'olivier. 11ème journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie (AUF).

Cherrat L., Espina L., Bakkali M., Pagan R., Laglaoui A., 2014. Chemical composition, antioxydant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *lavandula calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 22, 221-229.

Clark R.J., Menary R.C., 1980. Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Effect of day length, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. *Aust J Plant Physiol.*, 7: 685-692.

Conner D. E., 1993. Naturally occurring compounds, 441-468. *In* Antimicrobials in foods. Davidson P. M. and Branen A. L., 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Constantin E., 1996. Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1-14.

Cook C. M., Maloupa E., Kokkini S., and Lanaras T., 2007. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* plants from Zakynthos, Greece, *J. Essent.Oil Res.*, 19(3):239-243.

Cook C., Maloupa E., Kokkini S., and Lanaras T., 2000. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* L plants from Zakynthos

Greece, *J. Essent. Oil.Res.*,12: 598-600.

Costa A.and Fernandes J., Do Vale, 1952. Essential oil of *Mentha pulegium.*, *Not. Farm.*, 18:106-12.

CronquistA., TakhtadzhianA. L., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, 1262.

Croteau R., Gershenzon J., 1994. Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha*: Lamiaceae). *Rec Adv Phytochemistry*, 28: 193-229.

Cutter C.N., 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5): 601-607.

De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., 1999. Spectrométrie de Masse, 2e édition, Librairie Dunod, Paris.

De la Torre C.P., Torres O.A., 1977. Aceite esencial de *Mentha rotundifolia*. *Arch. Bioquim.Quim. Farm.*, 20: 85-88.

De Sousa Barros A., de Morais S.M., Ferreira P.A.T., Vieira Í.G.P., Craveiro A.A., dos Santos Fontenelle R.O., et al., 2015. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Ind Crops Prod.*, 76: 557-564.

Derwich E., Chabir R., Taouil R., Senhaji O., 2011. *In-vitro* antioxidant activity andGC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco. *Int.J. Pharm. Sci. Drug Res*, 3 (2): 130-136.

Echeverrigaray S., Basso R., Andrade L.B., 2005. Micropropagation of *lavendula dentate* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia plantarum*, 49: 439-442.

Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk N.H., Bacher A., 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms.

Chem Biol., 5: R221-R233.

El Arch M., Satrani B., Farah A., Bennani L., Boriky D., Fechtal M., et al., 2003. Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc, *Acta Botanica Gallica*, 150 : 267-274.

Ela M.A., El-Shaer N.S., Ghanem N.B., 1996. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51: 993- 995.

El-Ghorab A. H., 2006. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 9(2): 183-195.

FAO, 2018. Norme générale pour les additifs alimentaires- Codex stan.

Ferdjioui S. 2014. Variabilité chimique et intérêt économique des huiles essentielles de deux menthes sauvages : *Mentha pulegium* (Fliou) et *Mentha rotundifolia* (Domrane) de l'ouest algérien. Thèse de magister. Université abou bekr belkaïd de Tlemcen. Algérie.

Ferreira J.F.S., 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference totrichomes. *Int. J. Plant Sci.*, 156: 807-815.

Ferreira J.F.S., Janlck J., 1996. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua* pp. 579-584. In : Progress in new crops. Janick J. (ed.), ASHS Press, Arlington, VA.

Franzios G Mirotsou M., Hatziapostolou E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou. P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J Agri Food and Chemistry*, 45: 2690-2694.

Fujita S and Nezu K., 1985. Components of essential oils of *Mentha rotundifolia* (linn.) huds.ii (studies on the essential oils of the genus *Mentha*. Par, *Agric. Chem. Soc.*, 59(7): 703-706.

Fujita Y.and Fujita S., 1967. Essential oil of *Mentha pulegium* and *M. gratte fosseiview* from the standpoint of comparative biocheistry, *Nippon Kagaku Zasshi*, 88: 767-768.

Galambosi B., Aflatuni A., Sorvari K., 1998. Effect of cultivation techniques on mint oils in northern Finland. *Perfum. Flavor.*, 23: 27-31.

Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K., 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro*, 12: 473-8.

Gershenzon J., Maffei M., Croteau R., 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol*, 89:1351-1357.

Ghoulami S., Il Idrissi A., Fkih Tetouani S., 2001. Synthèse de nouveaux hétérocycles à partir de l'oxyde de piperiténone. *Tetrahedron Lett.*, 42: 2107-2109.

Grahle A., Hoeltzel C., 1963. Photoperiode Abhängigkeit und Bedeutung für des ätherischen Öl bei *Mentha piperita* L. *Naturwissenschaften*, 50: 552. In The yield and essential oil content of mint (*Mentha ssp.*) in Northern Ostrobothnia. Aflatuni A., 2005. Faculty of Science, University of Oulu, Department of Biology, Finland

Grundschober F., 1991. The identification of individual components in flavouring and flavoured foods, *Z. Lebensm. Unters. Forsh.*, 192: 530-534.

Guignard J.L., 1996. Métabolites secondaires-Biochimie végétal. Edition masson. 169- 231.

Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., and Bakhrouf A., 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine, *World J Microbiol Biotechnol.*, 25: 2227-2238.

Hayes J. R., Stavanja M.S., Lawrence B. M., 2006. Biological and Toxicological Properties of Mint Oils and their Major Isolates : Safety Assessment , *in Mint. The genus Mentha*. Brian M. Lawrence (ed.), CRC Press.

Hazzit M., 2008. Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes

espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. Th. Doctorat. USTHB Alger, 180P.

Hendriks H., Van Os F.H.L., 1976. Essential Oils of two chemotypes of *M. suaveolens* during ontogenesis. *Phytochemistry*, 15: 1127–1130.

Hirata T., Murakami S., Ogihara K., Suga T., 1990. Volatils monoterpénoid constituents of the plantlets of *Mentha spicata* produced by shoot tip culture. *phytochemistry*, 29(2): 493-495.

Holm V., Hiltunen R., Jokinen K., Tormala T., 1989. On the quality of the volatile oil in micropropagated peppermint. *J of Flav and Frag.*, 4: 81-84.

Huang L., Murashige T., 1977. Plant tissue culture media: major constituents; their preparation and some applications. *Tissue Culture Assoc Manual*, 3: 539–48.

Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C., Demirci F., 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. food Chemistry*, 50 (14): 3943-3946.

Jain M., Banerji R., Nigam S.K., Scheffer J.J.C., Chaturvedi H.C., 1991. *In vitro* production of essential oil from proliferating shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 57: 122-124.

Jordan A.M., Calvo M.C., Segura J., 1999. Micropropagation of adult *lavendula dendata* plants. *J. horst.Sci. Biotechnol.*73: 93-96.

Joulain D., 1994. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfum & Flavo.*, 19, 5-17.

Joulain D., König W.A., 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg.

Karuppusamy S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, 3:1222–39.

Khalilipour A. and Dejam M., 2014. Essential oil composition of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) from Southern Iran, *J. Herb. Drugs*, 5(1): 33-38.

Khosravi Zanjani M. A., Mohammadi N., Zojaji M., and Bakhoda H., 2015. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. and its antimicrobial activity on *proteus mirabilis*, *bacillus subtilis* and *zygosaccharomyces rouxii*, *J. Food Biosci. Technol. Islam. Azad Univ. Sci. Res. Branch*, 5(2): 31-40.

Kjonaas R., Croteau R., 1983. Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. *Arch Biochem Biophys*, 220: 79-89.

Klayman D.L., 1985. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from *China Science*, 228: 1049-1054.

Kokkini S., Handilou E., Karousou R., Lanaras T., 2002. Variations of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *J. Essent. Oil Res*, 14 : 224-227.

Kokkini S., Hanlidou E., Karousou R., and Lanaras T., 2004. “Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece,” *J. Essent. Oil Res.*, 16(6): 588-593.

Kokkini S., Karousou R., Lanaras T., 1995. Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the Island of Crete (Greece). *Biochem Syst and Ecology*, 23: 287-297.

Kokkini S., Papageorgiou V.P., 1988. Constituents of Essential Oils from *Mentha X rotundifolia* Growing Wild in Greece. *Planta Medica*, 38: 166–167.

Kováts E., 1965. Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, In *Advances in Chromatography*, 7: 229-247.

Ladjel S., Gherraf N., Hamada D., 2011. Antimicrobial effect of essential oils from the

Algerian medicinal plant *Mentha rotundifolia* L. *J appl Sci Res.*,7: 1665-1667.

Lahrech K., 2010. Extraction et analyses des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques, Thèse, Université d'Oran Es-Senia, Oran.

Lamaoui M., 2015. *In vitro* selection of argan tree genotypes (*Argania spinosa* L.) tolerant of water and salt stress and microbouting multiplication. Thesis. University Cadi Ayyad, Semlali.

Langston R.G., Leopold A.C., 1954. Photoperiodic responses of peppermint. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 63: 347-52.

Lawrence B.M., 1981. Monoterpene interrelationships in the *Mentha* genus: a biosynthetic discussion. In *Essential Oils*. BD Mookherjee, CJ Mussinan, eds, Allured Publishing, Wheaton, IL, 1-81.

Lawrence M., 1978. A study of the monoterpene interrelationships of the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran, Netherlands.

Lawrence M.B., 2007. Mint: The genus *Mentha*. Medicinal and aromatic plants Industrial profiles. CRC Press Taylor and Francis group, 556 p.

Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A., Rohmer M., 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett*, 400: 271–274.

Lieutaghi P., 1966. Le livre des Bonnes Herbes, Marabout service, Robert Morel éditeur.

Longevialle P., 1981. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris.

Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Canigueral S., 2002. Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil.*

Technol,45(4) : 519-524.

Lydie Suty., 2014. Les végétaux. Evolution, développement et reproduction. Edition Quæ, Versailles Cedex, France.p42.

Mahboubi M., Haghi G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, 119: 325-327.

McCaskill D.G., Croteau R., 1999. Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett*, 40: 653-656.

McCaskill D.G., Gershenzon J., Croteau R., 1992. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta*, 187: 445–454.

McLafferty F.W., Michnowicz J.A., 1992. State-of-the-art GC-MS, *Chemtech.*, 182-189.

McLafferty F.W., Tureček F., 1993. Interpretation of mass spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California.

Meena M.R., Sethi V., 1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *J. Food Sci. and Tech. Mysore*, 31: 68-70.

Mendoza-Yepes M.J., Sanchez-Hidalgo L.E., Maertens G., Marin-IniestaF., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil(DMC) en Spanish soft cheese. *J. Food Safety*, 17: 47-55.

Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013. Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja Montana* L.essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella* Spp. strains. *J. Chemistry*, 2013: 9-18.

Mkaddem M., Boussaid M., and Fadhel N. B., 2007. Variability of volatiles in Tunisian

Mentha pulegium L. (*Lamiaceae*), *J. Essent. Oil Res.*, 19(3): 211-214.

Mohaddese M., Haghi G., 2008. Essential oil. *J. Ethnopharm.*, 119(2): 325-329.

Moldovan R. I. and Oprean R., 2014. Comparative study of essential oil from two species of mint grown in Orăștie,” *Farmacia*, 62(1): 169-182.

Murashige T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann Rev Plant Physiol.*, 25:135–66.

Murashige T., 1977. Manipulation of organ culture in plant tissue cultures. *Botanical Bull Acad Sinica.*, 18: 1-24.

Murashige T., 1980. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In *Plant Growth Substances*. Skoog F, editor. Berlin: Springer-Verlag, 426-34.

Murashige T., skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant physi*, 15(3):473-497.

Mzouri K., Amssa M., Bouiamrine E.H., 2000. Embryogenèse somatique à partir d’embryons immature de blé tendre. Effet génotypique. *Afr Crop Sci J*, 2 (9): 339- 350.

Nagell A., Hefendehl F.W., 1974. Composition of the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Planta Medica.*, 26: 1-8.

Namdeo A. G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.

Németh K., 1979. The availability of nutrients in the soil as determined by electro-ultrafiltration (EUF), *Adv. Agron.*, 31: 155-186.

Németh G., 1986. Induction of rooting. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I*, Bajaj, Y.P.S. (Ed.), vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 49-64.

Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z., and Spiegel Y., 2000. Nematicidal Activity of essential oils and their components against the root-knot nematode, *Am. Phytopathol. Soc.*, 90(7): 710-715.

Ouakouak H., Chohra M., and Denane M., 2015. “Chemical composition, antioxidant activities of the essential oil of *Mentha pulegium* L, south east of Algeria,” *Int. Lett. Nat. Sci.*, 39 : 49-55.

Oudhia P., 2003. Traditional and medicinal knowledge about pudina (*Mentha* sp. family: Labiatae) in Chhattisgarh, India. Botanical.Online, <http://botanical.com>.

Oumzil H., Ghaulami S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M., Benjouad A., 2002. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytoter. Res.*, 16: 727-731.

Paul A., Thapa G., Basu A., Mazumdar P., Kalita M.C., Sahoo L., 2010. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Bench. - An industrially important aromatic plant. *Industrial crops and products*, 32: 366-374.

Perez-Raya M.D., Utrilla M.P., Navarro M.C., Jiménez J., 1990. CNS activity of *mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in Mice and Rats. *Phytoter. Res.*, 4 : 232-234.

Petrakis E. A., Kimbaris A. C., Pappas C. S., Tarantilis P. A., and Polissiou M. G., 2009. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by ft-ir spectroscopy, *J Agric Food Chem*, 57(21): 10044-10048.

Phatak S.V., Heble M.R., 2002. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. *Fitterapia*, 73: 32–39.

Pibiri M.C., C. Seigniez et al., 2001. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT 2001*, Lausanne.

Pino J.A., Rosado A., Fuentes V., 1998. Essential Oil of *Mentha spicata* (L.) from Cuba. *J. Essen.Oil Res.*, 10: 657–659.

Purkayastha J., Sugla T., Solleti S.K., Paul A., Sahool L., 2008. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *andropogon paniculata*: a valuable medicinal plant. *In vitro cell dev.Biol*, 43: 409-414.

Purohit S.D., Singhvi A., 1998. Micropropagation of *achras sapota* through enhanced axillary branching. *Sci. Hort*, 76: 209-229.

Quezel et Santa 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. 785-786.

Ramachandra Rao S., 1998. Studies on biotransformation to produce phytochemicals of importance using plant cell cultures. PhD Thesis. University of Mysore, Mysore. India.

Randhawa G.S., Mahey R.K., Sidhu B.S., Saini S.S., 1988. Effect of growth regulators on emergence, herb and oil yields of *Mentha* species. Vth ISHS symposium on medical and aromatic spices plants. *Acta Horticulturae*, 188: 169-173.

Rao S.R., Ravishankar G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 20:101–53.

Ravishankar G.A., Bhyalakshmi N., Ramachandra Rao S., 1999. Production of food additives. In: *Biotechnology: secondary metabolites*. Ramawat KG, Merillon JM, editors. New Delhi: Oxford IBH, 89-110.

Ravishankar G.A., Venkatarman L.V., 1988. Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of *Mentha piperita*. *Philippine Journal of Science*, 117: 121–129.

Raya M. D. P., Utrilla M. P., Navarro M. C., and Jiménez J., 1990. CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytother. Res.*, 4(6): 232-234.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Bio Med.*, 26:1231-1237.

Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., et al., 2013. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Ind. Crops Prod.*, 49: 883-889.

Rodrigues L., Póvoa O., Teixeira G., Figueiredo A. C., Moldão M., and Monteiro A., 2013. Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Ind. Crops Prod.*, 43: 692-700.

Rout G.R., Das P., 1997. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *J Herbs Spices Medicinal Plants*, 4(4):41-51.

Rout G.R., Samantaray S., Das P., 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotech Adv*, 18: 91-120.

Ruberto G., Baratta M., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69:167–174.

Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M.H., 1998. Differential incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. *J Chem Soc Chem Commun*, 221: 221-222.

Sarikurkcu C., Eryigit F., Cengiz M., Tepec B., Cakir A., and Mete E., 2012. Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. from Turkey. *Spectrosc. Lett. Int. J. Rapid Commun.*, 45(5): 352-358.

Savajol N., 2004. Expérimentation sur un antipaludique, l'Artemisia annua, au Cambodge. Mémoire de fin d'études. Nomad RSI, Toulouse.

Seigler D.S., 1998. Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers. London, 759.

Shimizu S., 1956. Studies of the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 20(2): 84-88.

Shimizu S., 1957. Studies on the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 21(2): 107-114.

Silva L. F., das G M., Cardoso, Batista L. R., Gomes M. de S., Rodrigues L. M. A., et al., 2015. Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. *Am. J. Plant Sci.*, 6: 666–675.

Singh A, Vishw akarma R.A., Husan A., 1988. Evaluation of *Artemisia annua* strain for higher artemisinin production. *Planta medica*, 7: 475-476.

Sivropoulou A., Kokkiki S., Lanaras T., Arsenakis M., 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J Agric Food Chemistry*, 43: 2384-2388.

Skoog F., Miller C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In Biological Action of Growth Substances. Xth Symp Soc Expl Biol, Cambridge Univ Press, 118-31.

Small E., 1997. Mentha-mint family (Lamiaceae). In Culinary Herbs. Ottawa, Ontario, Canada. NRC Research Press, 351-372.

Steward, F.C., 1962. Mentha as a plant for physiological investigations. In Growth, Nutrition and Metabolism of *Mentha piperita* L., Part I. Cornell Univ. *Agric. Exp. Sta. Mem.* No. 379.

Stoyanova A., Georgiey E., Kula J., and Maida T., 2005. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* l. from Bulgaria. *J. Essent. Oil Res.*, 17(5): 475-476.

Sudria C., Pinol M.T., Palazon J., Cusido R.M., Vila R., Morales C., Bonfill M., Canigueral S., 1999. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil

content of cultured *lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell Tiss.Org. Cult*, 58: 177-184.

Sun Y., Zho Y., Wang X., Qiao G., Chen G., Yang Y., Zhou J., Jin L., Zhuo R., 2009. Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment. *Acta Physiology Plant*, 31:33-41.

Sutour S., 2010. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat. Université de corse pascal Paoli .Faculté des sciences et techniques.

Taiz L., Zeiger E., 1998. Plant physiology, 2nd ed. Sinaur Associates,Sunderland, MA,USA.

Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., et al., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crops Prod*, 36:81-87.

Thompson D.P., 1989. Fungitoxic activity of essential oils components on food storage fungi. *Mycologia*, 81: 151-153.

Tisserart B., 1981. Date Palm Tissue culture. Oakland, CA: US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Torres K.C., 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. New York: Van Nostrand Reinhold Co.

Turner G., Gershenzon J., Nielson E.E., Froehlich J.E, Croteau R., 1999. Limonene synthase responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiol.*, 120: 879-886.

Umemoto K., Arai T., Nii H., Furukawa K., 1994. Chemical constituents of wild mints. Part XX. Essential oil of self-pollinated plants of *Mentha aquatica* with sesquiterpene alcohols as major components. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 68: 1567.

Van Den Dool H., Kratz P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 11, 463-471.

Velasco-Negueruela A., Perez-Alonso M.J., Esteban J.L., Garcia Vallejo M.C., Zygaldo J.A., Guzman C.A., et al ., 1996. Essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi and *Mentha aff suaveolens* Ehrh. grown in Cordoba, Argentina. *J. Essent. Oil Res*, 8 : 81-84.

Venskutonis P.R., 1996. A chemotype of *Mentha longifolia* L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *J. Essent. Oil Res*, 8: 91-95.

Verpoorte R., Contin A., Memelink J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Rev*, 1:13-25.

Wang J., Li R., Tan J., and Jiang Z.-T., 2013. Effect of drying on essential oil yields and chemical composition of pineapple mint (*Mentha rotundifolia* „variegata“) from China, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 16(5): 630-635.

wichtl M., anton R., 2003. Plantes therapeutiques, Edition Tec & Doc. Lavoisier.

Wink M., 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. 2^{ème} ed. (*In Annual plant reviews*, vol 40) Blackwell Publishing Ltd.

Yasa H., Onar H. Ç., and Yusufoglu A. S., 2012. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* l. from Bodrum, Turkey, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 15(6): 1040-1043.

Zantar S., Haouzi R., Chabbi M., Laglaoui A., Mouhib M., Boujnah M., et al., 2015. Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils, *Radiat. Phys. Chem.*, 115: 6–11.

Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M., 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidences for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and chemical toxicology*, 48: 3144-3152.

Zekri N., Amalich S., Boughdad A., El Belghiti M. A., and Zair T., 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*, *Mediterr. J. Chem.*, 2(4): 607-619.

Zryd J. P., 1988. Culture des cellules, des tissus et organes végétaux. Ed. Presse, Paris.

Zuzurate M.R., Dinis A.M., Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Canhoto J.M., 2010. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Ind Crops prod.*, 32: 580-587.

Zwaving J.H., Smith D., 1971. Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Photochemistry*, 10: 1951-1953.

ANNEXES

Composition chimique du milieu MS (Murashige et Skoog; 1962)

Composition chimique	concentration (mg/l)	solution mère (g/l)
Macroéléments (20X)		
NH ₄ NO ₃	1650	33
KNO ₃	1900	38
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7.4
KH ₂ PO ₄	170	3.4
Microéléments (100X)		
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	2.23
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	0.86
H ₃ BO ₃	6.20	0.62
Ki	0.83	0.083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0025
NaFe EDTA (100X)		
Na ₂ EDTA	37.25	3.725
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	2.785
Additifs(1000X)		
Acide nicotinique	0.5	0.5
Pyridoxine HCL	0.5	0.5
Thiamine HCL	0.1	0.1
Glycine	2	2

Myo-inositol 0.1g/l

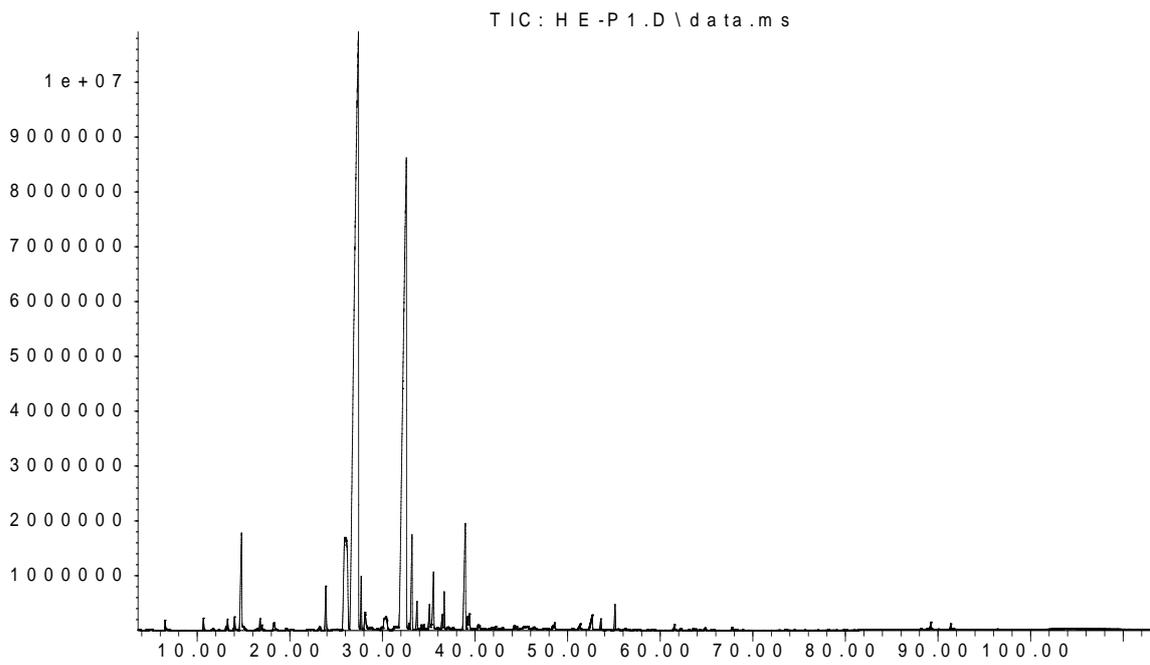
Saccharose 30g/l

Agar 7g/l

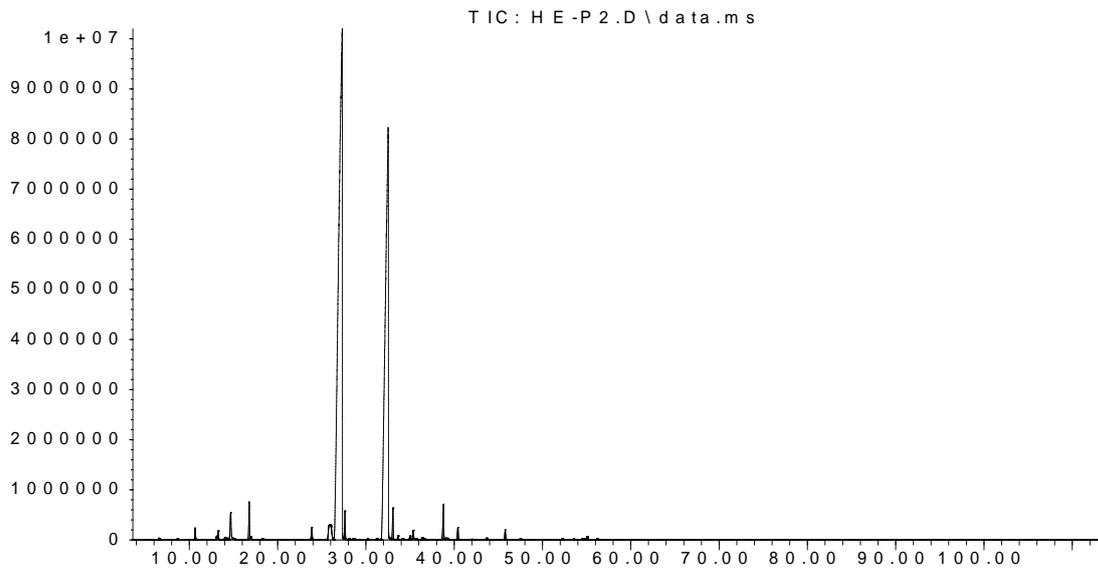
Ajuster le PH à 5.6-5.8

Autoclaver à 121°C pendant 30min

Abundance

Chromatogramme de l'huile de plante *mentha pulegium* sauvage

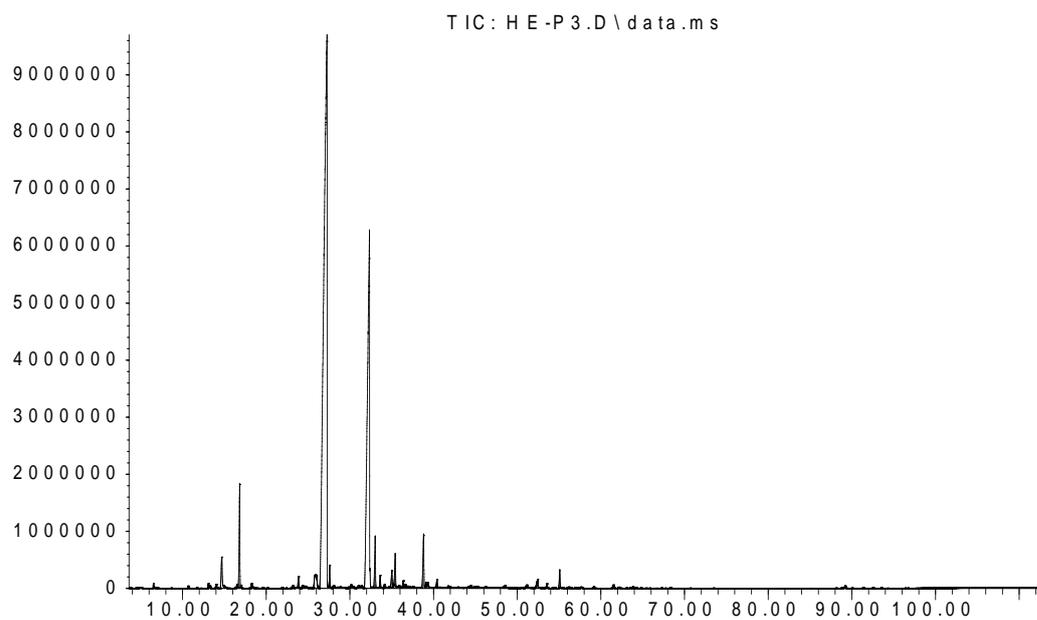
Abundance



Time-->

Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 25°C -16h/8h (in vitro)

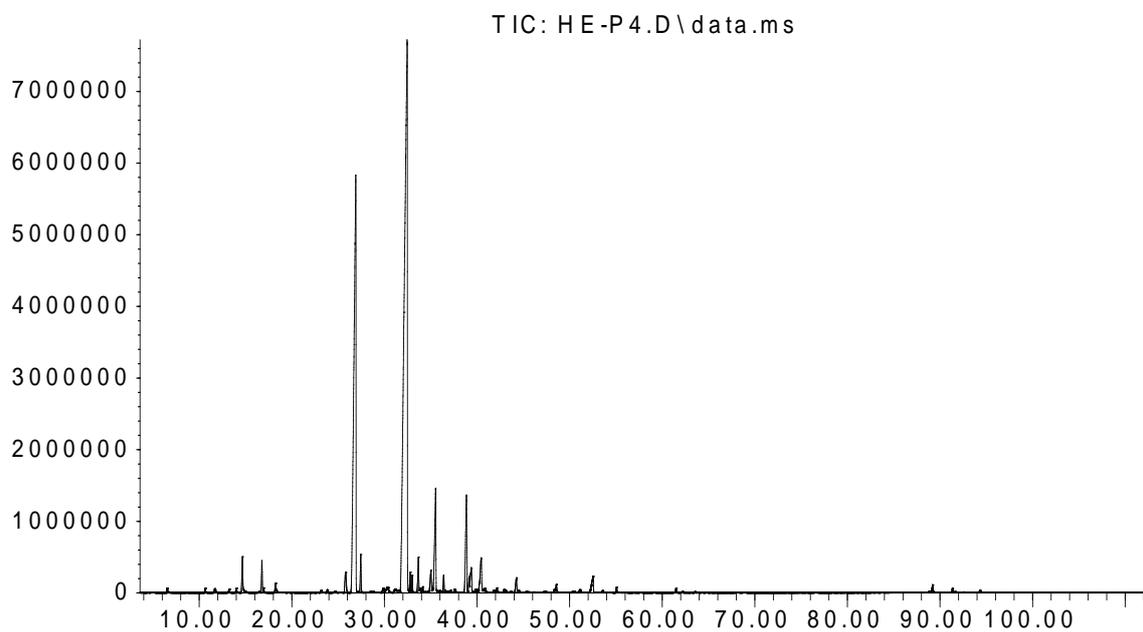
Abundance



Time-->

Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 25°C -16 h/8h (témoin)

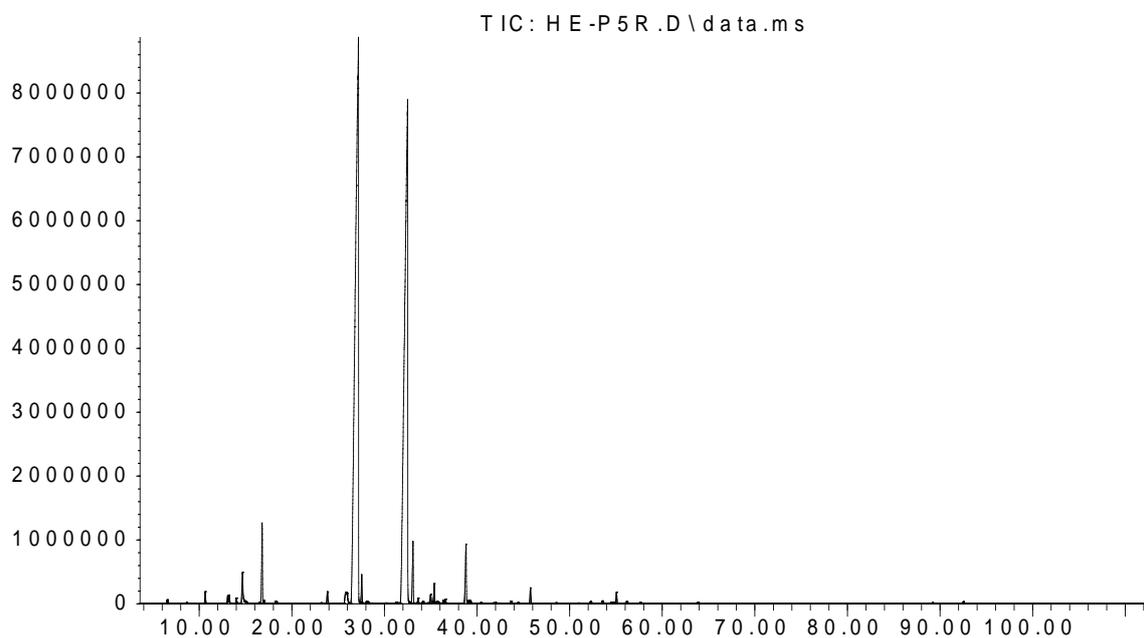
Abundance



Time-->

Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 35°C -16 h/8h

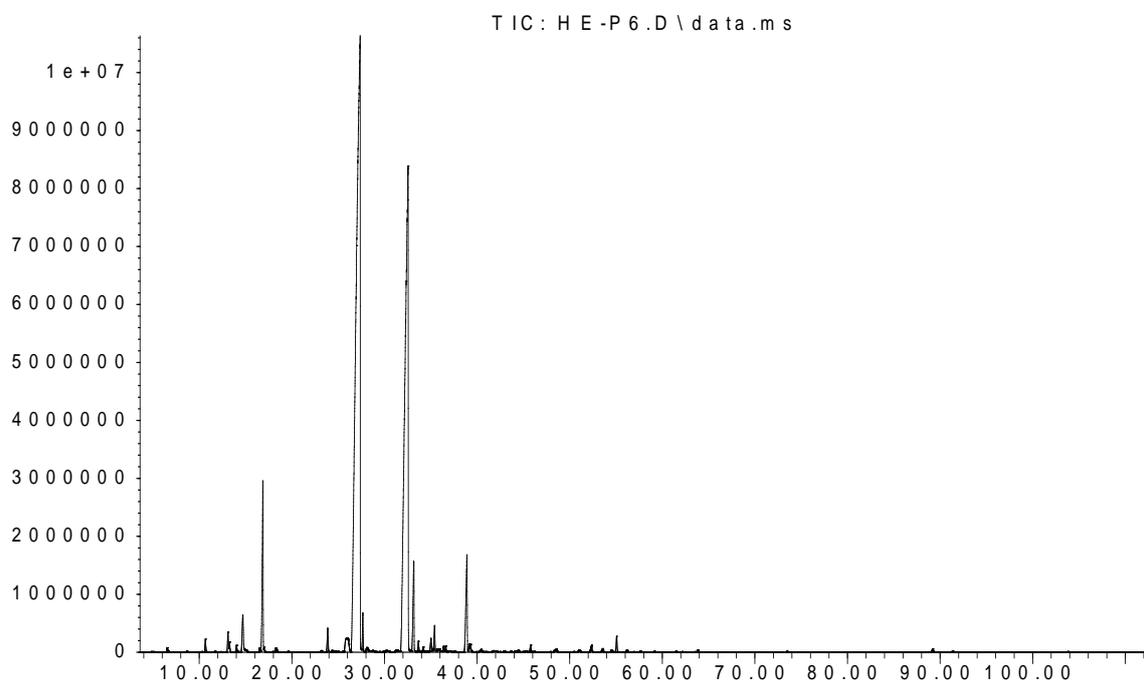
Abundance



Time -->

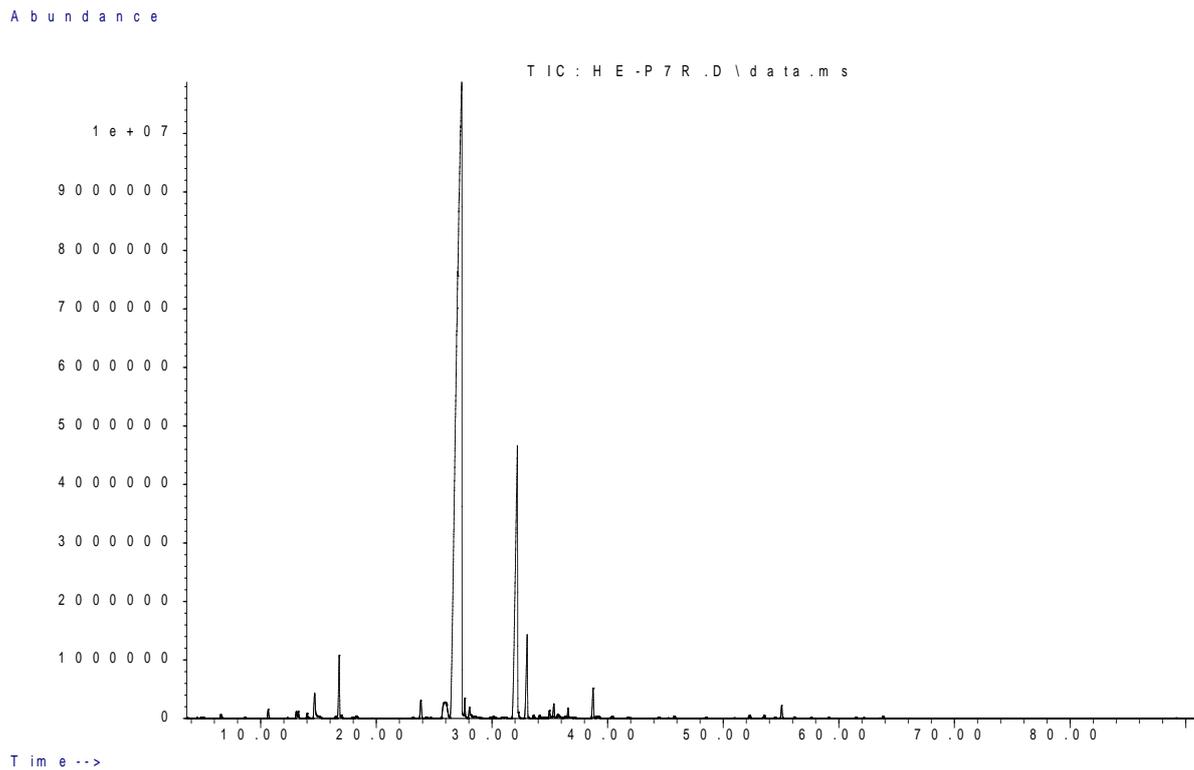
Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 16°C -16 h/8h

Abundance

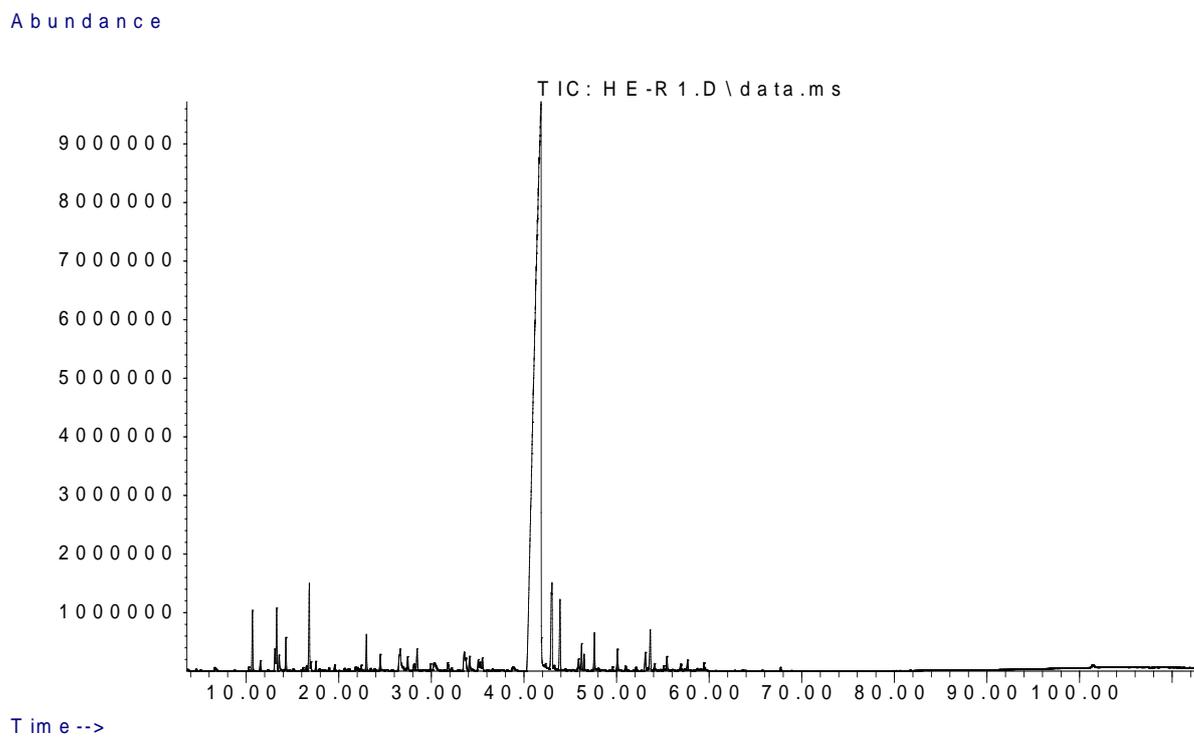


Time -->

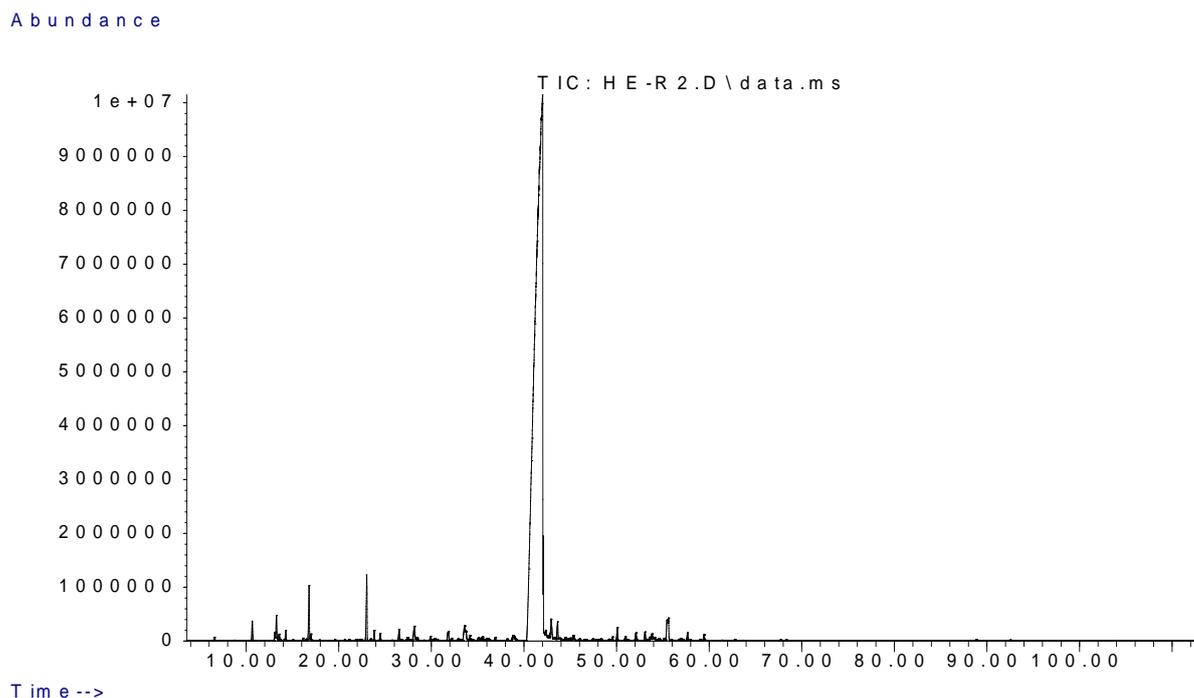
Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 25°C - 8h/16h



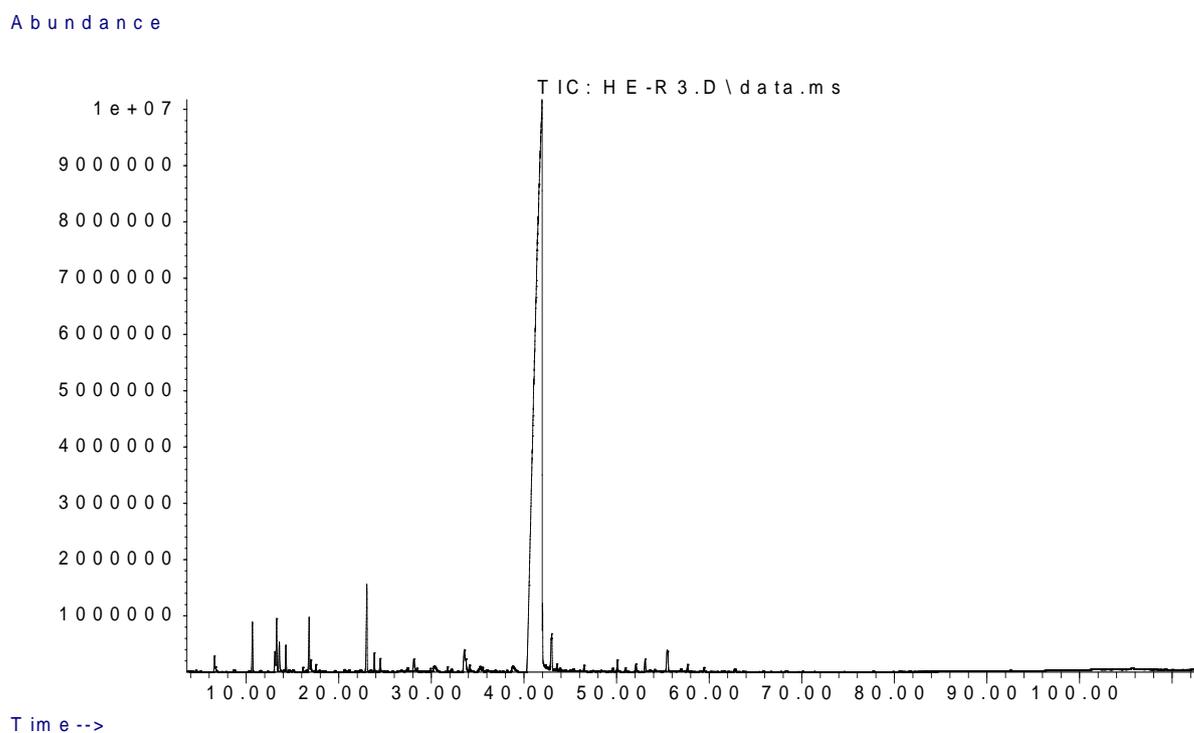
Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha pulegium* acclimatée à 25°C -7j obs



Chromatogramme de l'huile de plante *mentha rotundifolia* sauvage

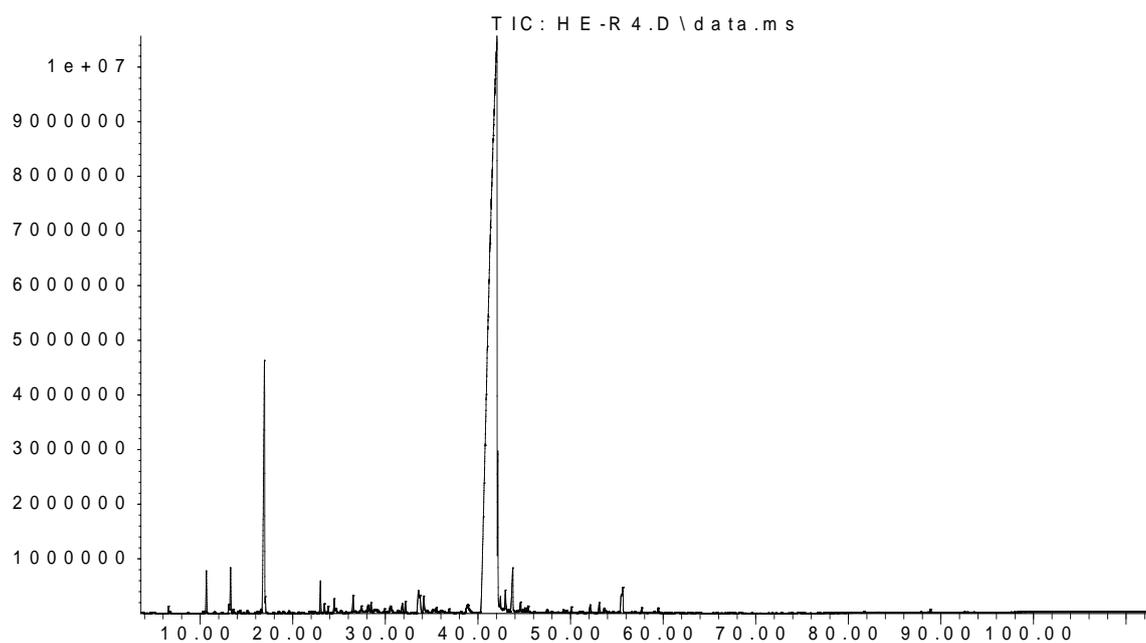


Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 25°C -16h/8h(in vitro).



Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 25°C -16h/8h(témoin).

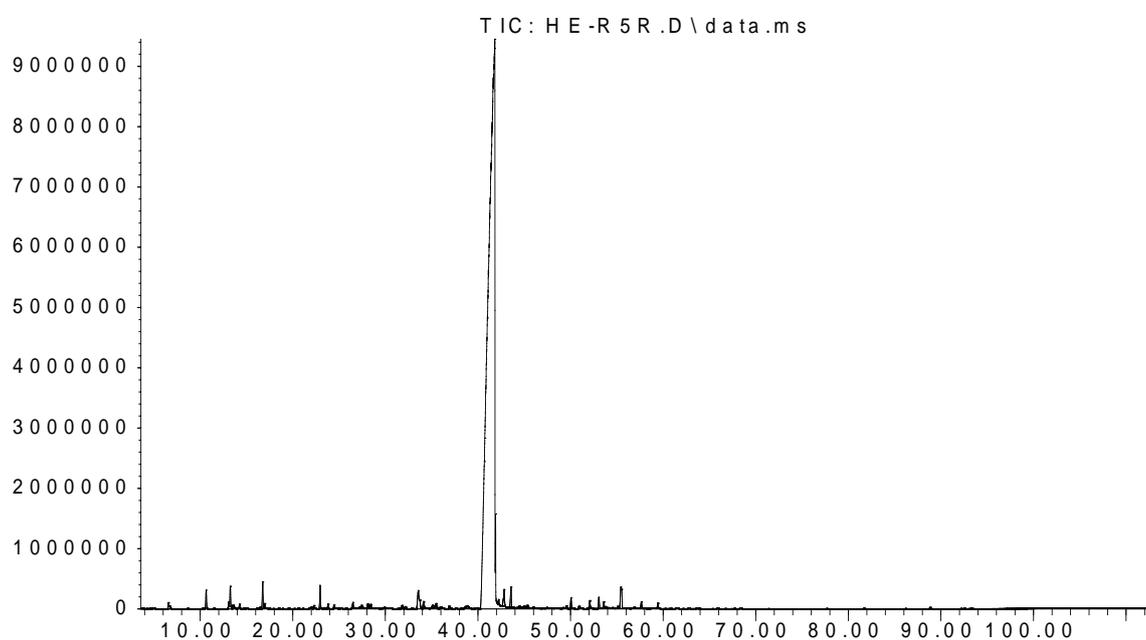
Abundance



Time -->

Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 35°C -16h/8h.

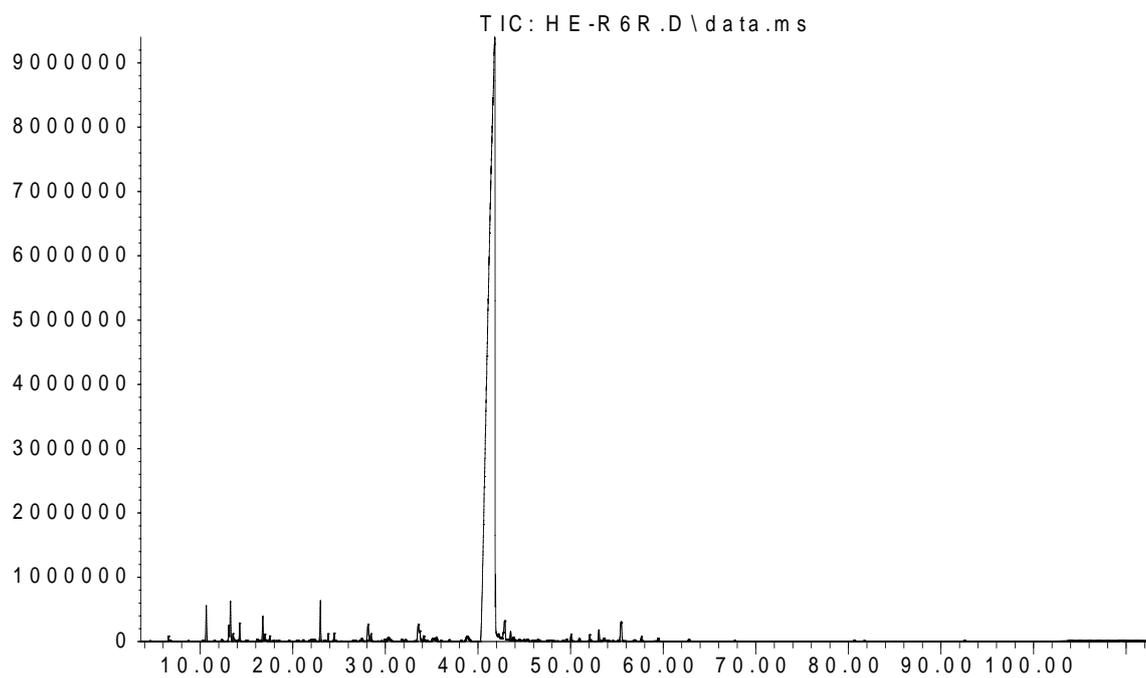
Abundance



Time -->

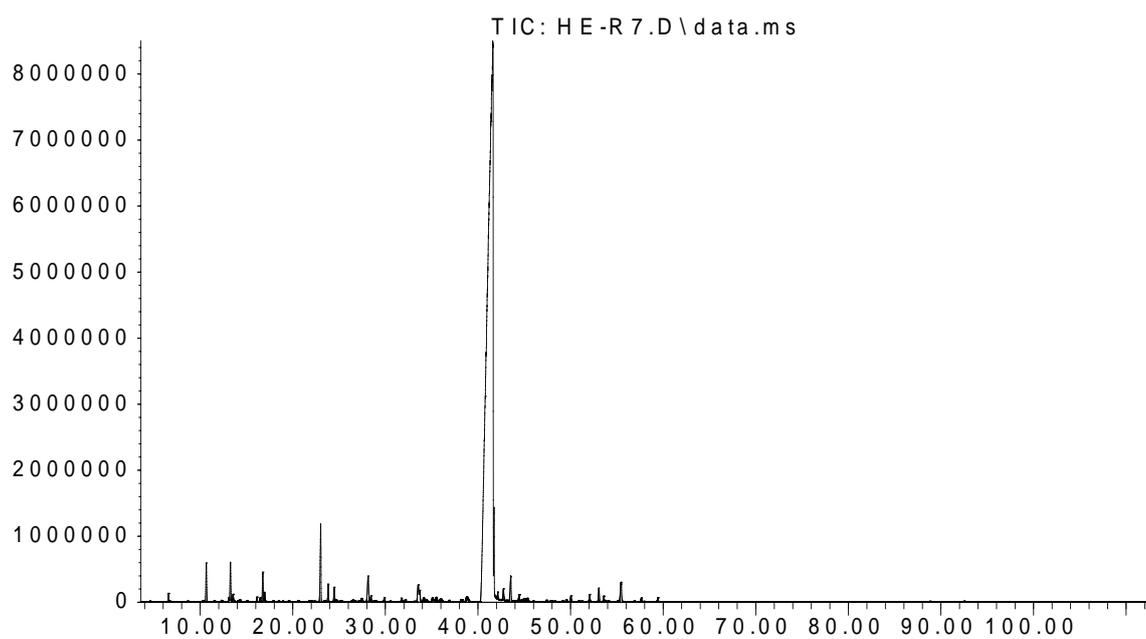
Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 16°C -16h/8h.

Abundance



Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 25°C -8h/16h.

Abundance



Chromatogramme de l'huile de plantules de *mentha rotundifolia* acclimatée à 25°C -7j obs.

Moyennes

Tableau de bord

Rendement

SourcesHE	Moyenne	N	Ecart-type
MP sauvage	,9667	3	,05774
MP invitro	1,5700	3	,15716
MP 25°C	,9433	3	,00577
MP 16°C	1,1567	3	,05774
MP 35°C	1,8433	3	,00577
MP 16obs/8lum	1,3667	3	,01155
MP 7j obs	1,6467	3	,01155
Total	1,3562	21	,33555

ANOVA à 1 facteur

Rendement

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2,188	6	,365	80,544	,000
Intra-groupes	,063	14	,005		
Total	2,252	20			

Sous-ensembles homogènes

Rendement

	SourcesHE	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Test de Tukey ^a	MP 25°C	3	,9433				
	MP sauvage	3	,9667				
	MP 16°C	3		1,1567			
	MP 16obs/8lum	3			1,3667		
	MP invitro	3				1,5700	
	MP 7j obs	3				1,6467	
	MP 35°C	3					1,8433
	Signification			,999	1,000	1,000	,796

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Tableau de bord

rendement

SourcesHE	Moyenne	N	Ecart-type
MR sauvage	,7333	3	,05774
MR invitro	,4567	3	,11547
MR 25°C	,8900	3	,08660
MR 16°C	,8800	3	,06928
MR 35°C	1,4833	3	,00577
MR16obs/8lu	1,4867	3	,25325
MR 7Jobs	,9667	3	,01155
Total	,9852	21	,37250

ANOVA à 1 facteur

rendement

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2,589	6	,431	32,381	,000
Intra-groupes	,187	14	,013		
Total	2,775	20			

Sous-ensembles homogènes

rendement

	SourcesHE	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	MR invitro	3	,4567		
	MR sauvage	3	,7333	,7333	
	MR 16°C	3		,8800	
	MR 25°C	3		,8900	
	MR 7Jobs	3		,9667	
	MR 35°C	3			1,4833
	MR16obs/8lu	3			1,4867
	Signification			,115	,239

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium* (Plante-mère)*ANOVA à 1 facteur**

Diamètres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	9949,733	4	2487,433	318,902	,000
Intra-groupes	78,000	10	7,800		
Total	10027,733	14			

Sous-ensembles homogènes

Diamètres

	Souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Test de Tukey ^a	B.subtilis	3	14,6667	
	S.enteritidis	3	17,6667	
	S.aureus	3	20,3333	
	A.brasiliensis	3		70,0000
	C.albicans	3		70,0000
	Signification			,170

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium (vitro plants)**ANOVA à 1 facteur**

Diametrs

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	8523,733	4	2130,933	273,197	,000
Intra-groupes	78,000	10	7,800		
Total	8601,733	14			

Sous-ensembles homogènes

Diametrs

	Souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	11,3333			
	B.subtilis	3	15,0000	15,0000		
	S.aureus	3		21,3333		
	A.brasiliensis	3			56,6667	
	C.albicans	3				70,0000
	Signification			,525	,110	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium (vitro plants)**ANOVA à 1 facteur**

diamètres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2840,267	4	710,067	88,025	,000
Intra-groupes	80,667	10	8,067		
Total	2920,933	14			

Sous-ensembles homogènes

diamètres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	8,6667			
	S.aureus	3		18,3333		
	C.albicans	3			33,3333	
	B.subtilis	3			35,3333	
	A.brasiliensis	3				48,0000
	Signification			1,000	1,000	,904

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium* Culture A*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	6314,933	4	1578,733	33,976	,000
Intra-groupes	464,667	10	46,467		
Total	6779,600	14			

Sous-ensembles homogènes

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	20,3333	
	S.aureus	3	20,6667	
	B.subtilis	3	22,6667	
	A.brasiliensis	3		53,3333
	C.albicans	3		70,0000
	Signification			,992

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium* Culture B*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	6387,600	4	1596,900	295,722	,000
Intra-groupes	54,000	10	5,400		
Total	6441,600	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	13,6667			
	B.subtilis	3	17,6667	17,6667		
	S.aureus	3		20,0000		
	C.albicans	3			26,6667	
	A.brasiliensis	3				70,0000
	Signification			,288	,736	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium Culture C

ANOVA à 1 facteur

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	6053,733	4	1513,433	329,007	,000
Intra-groupes	46,000	10	4,600		
Total	6099,733	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	B.subtilis	3	15,6667		
	S.aureus	3	17,3333		
	C.albicans	3		24,6667	
	S.enteritidis	3		25,0000	
	A.brasiliensis	3			70,0000
	Signification			,870	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium* Culture D*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	7142,933	4	1785,733	62,878	,000
Intra-groupes	284,000	10	28,400		
Total	7426,933	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Test de Tukey ^a	B.subtilis	3	11,3333	
	S.enteritidis	3	13,3333	
	S.aureus	3	18,0000	
	C.albicans	3	22,6667	
	A.brasiliensis	3		70,0000
	Signification		,143	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.pulegium* Culture E*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	6971,067	4	1742,767	100,932	,000
Intra-groupes	172,667	10	17,267		
Total	7143,733	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	13,6667	
	C.albicans	3	14,0000	
	S.aureus	3	19,0000	
	B.subtilis	3	19,0000	
	A.brasiliensis	3		70,0000
	Signification			,544

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.rotundifolia Culture A

ANOVA à 1 facteur

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1960,267	4	490,067	25,884	,000
Intra-groupes	189,333	10	18,933		
Total	2149,600	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	S.aureus	3	21,6667		
	S.enteritidis	3	23,3333		
	B.subtilis	3	29,3333	29,3333	
	C.albicans	3		35,3333	
	A.brasiliensis	3			53,3333
	Signification			,269	,481

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.rotundifolia* Culture B*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4596,400	4	1149,100	161,089	,000
Intra-groupes	71,333	10	7,133		
Total	4667,733	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Test de Tukey ^a	S.aureus	3	19,6667			
	S.enteritidis	3	26,0000	26,0000		
	C.albicans	3		32,6667	32,6667	
	B.subtilis	3			39,0000	
	A.brasiliensis	3				70,0000
	Signification			,091	,072	,091

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.rotundifolia Culture C

ANOVA à 1 facteur

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2934,933	4	733,733	63,253	,000
Intra-groupes	116,000	10	11,600		
Total	3050,933	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	S.enteritidis	3	17,3333		
	B.subtilis	3	19,0000		
	S.aureus	3	22,6667		
	C.albicans	3		32,0000	
	A.brasiliensis	3			55,3333
	Signification			,368	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.rotundifolia* Culture D*ANOVA à 1 facteur**

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1500,267	4	375,067	54,621	,000
Intra-groupes	68,667	10	6,867		
Total	1568,933	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	S.aureus	3	16,3333		
	S.enteritidis	3	23,3333		
	C.albicans	3		31,3333	
	B.subtilis	3		33,3333	
	A.brasiliensis	3			46,0000
	Signification			,052	,877

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

M.rotundifolia Culture E

ANOVA à 1 facteur

diametres

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4618,667	4	1154,667	171,485	,000
Intra-groupes	67,333	10	6,733		
Total	4686,000	14			

diametres

	souches	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
			1	2	3
Test de Tukey ^a	S.aureus	3	20,0000		
	S.enteritidis	3	24,6667		
	C.albicans	3		34,0000	
	B.subtilis	3		36,3333	
	A.brasiliensis	3			70,0000
	Signification			,254	,802

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

ملخص

تم تنفيذ الإكثار الدقيق لنوعين عطريين محليين ، هما *M. pulegium* و *M. rotundifolia* ، مع هدف مزدوج: من جهة لتحديد الظروف المثلى لزراعة وإعادة تجديد النوعين ، ومن ناحية أخرى لتحديد تأثير ظروف التأقلم (درجة الحرارة ومدة الإضاءة) على التركيب الكمي والنوعي للزيوت الأساسية ، وكذلك خصائصها المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات. تم استزراع النباتات في وسط (MS) Murashige et Skoog وتأقلمها تحت ظروف الإجهاد (درجة الحرارة ومدة الإضاءة). الزيوت العطرية للنباتات الأم والنباتات المختبرية ، التي تم الحصول عليها عن طريق hydrodistillation ، تم دراستها باستعمال الكروماتوغرافيا الغازية متزاوجة المطيافية الكيمائية (CPG-M). تم دراسة الفعالية البيولوجية للزيوت الأساسية (فعالية مضادة للبكتيريا، مضادة للأكسدة) بواسطة الاختبارات القياسية (DPPH ، ABTS ، CUPRAC) و (نشر) ، على التوالي. تم الانتهاء من تحريض النباتات في المختبر في وسط (MS) مضاف إليه 1 ملغ / لتر BAP و 1 ملغ / لتر GA3 . تم التحصل على الإكثار في وسط (MS) مضاف إليه 5,0 ملغ / لتر BAP و 5,0 ملغ / لتر GA3 لـ *Mentha rotundifolia* ومضاف إليه 5,0 ملغ / لتر BAP و 1 ملغ / لتر GA3 لـ *Mentha pulegium*. تم تأقلم كل من أنواع النعناع المتجذرة في المختبر مع معدل بقاء الكلي أكبر من 96 ٪. فيما يتعلق بإنتاج الزيوت الأساسية ، فقد أظهرت التلاعبات التي أجريت على الضوء ودرجة الحرارة أنه من الممكن زيادة محصولها بشكل كبير وتوجيه التركيب الحيوي بشكل تفضيلي مقارنة بالمركبات ذات القيمة المضافة العالية (l-menthone ، oxide piperitenone) أو ضد الجزيئات ذات تأثير ضار (pulegone كبدية).

وقد أظهر هذا العمل أن المعاملين اللاحيويين (درجة الحرارة والضوء) لهما تأثير إيجابي على الفعالية المضادة للأكسدة للزيوت الأساسية للنباتات المختبرية بينما يكون تأثيرها على الفعالية المضادة للميكروبات أقل وضوحاً. وأخيراً ، أدت نتائج هذه الدراسة إلى إنشاء بروتوكول فعال للإكثار الدقيق في المختبر من خلال استزراع البراعم الابضية الرقيقة ، مع إمكانية الزيادة في المردود و توجيه النمط الكيمائي للزيوت الأساسية من أجل استخدام مستقبلي على المستوى التجاري.

الكلمات المفتاحية:

M. rotundifolia ، *M. pulegium* ، الإكثار الدقيق ، الزيت العطري ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract:

Micropropagation of two local species *M. rotundifolia* and *M. pulegium* has been carried with two main objectives: firstly, to set up optimal conditions for culture and regeneration of the two species, then evaluate temperature and photoperiod stress conditions on the EO composition and the antioxidant and antimicrobial activities. Explant of the two species was settled on culture with MS medium, acclimated under temperature and photoperiod stress conditions. Mother plants and *in vitro* plants EO were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. Antioxidant and antimicrobial activities of EO were carried out with standards methods (DPPH, ABTS, and CUPRAC) and (diffusion), respectively. Cultures inductions were achieved with MS medium supplemented with 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃. Explants multiplications of *M. rotundifolia* and *M. pulegium* were successfully done on MS medium supplemented with 0,5 mg/l BAP +0,5 mg/l GA₃ and 0,5 mg/l BAP +1 mg/l GA₃, respectively. *In vitro* rooted plants of the two mints species were well acclimated with a total survival rate greater than 96%. Regarding EO production, photoperiod and light stress assays have shown a significant increase in EO content and selective biosynthesis orientations in relation with phyto-constituents with high value (*l*-menthone, oxyde de piperitenone) or with side effects (hépatotoxique pulegone). This study has shown that abiotic parameters (light and photoperiod) positively affect *in vitro* plants EO antioxidant activities, while no obvious effect was observed for antimicrobial activities. Finally, the results of this study led to the establishment of an effective *in vitro* micropropagation protocol from *Mentha* axillary buds, with the possibility to increase yield and / or to direct the chemical profile of EO for future commercial use.

Key words: *M. pulegium*; *M. rotundifolia*; micropropagation; essential oil; antioxidant activity, antimicrobial activity.

Résumé

La micropropagation de deux espèces aromatiques locales, à savoir *M. rotundifolia* et *M. pulegium* a été entreprise dans un double objectif : d'une part déterminer les conditions optimales pour la culture et la régénération des deux espèces, et d'autre part déterminer l'effet du stress thermique et lumineux sur la composition quantitative et qualitative des HE, ainsi que sur leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Les explants des deux plantes ont été mis en culture sur milieu MS et acclimatées dans des conditions de stress thermique et lumineux. Les HE des plantes-mères et des *vitro plants*, obtenues par hydrodistillation, ont été caractérisées par CPG-MS. Les activités antioxydantes et antimicrobiennes des HE ont été réalisées par les tests standards (DPPH, ABTS, CUPRAC) et (diffusion), respectivement. L'induction des *vitro plants* a été achevée sur milieu MS additionné de 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA3. Les multiplications des *vitro plants* de *M. rotundifolia* et *M. pulegium*, ont été réalisées sur milieu MS additionné de 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA3 et additionné de 0,5 mg/l BAP + 1 mg/l GA3, respectivement. Les deux espèces de Menthe enracinées *in vitro* ont été bien acclimatées avec un taux de survie total supérieur à 96%. En ce qui concerne la production des HE, les manipulations faites sur la lumière et la température ont montré qu'il est possible d'augmenter significativement leur rendement et orienter préférentiellement leur biosynthèse par rapport aux composés à forte valeur ajoutée (*l*-menthone, oxyde de piperitenone) ou par rapport aux molécules à effet indésirable (pulegone hépatotoxique). Ce travail a montré que les deux paramètres abiotiques (température et photopériode) impactent positivement sur l'activité antioxydante des HE produites dans les cultures alors que son effet sur l'activité antimicrobienne est moins évident. Enfin, les résultats de la présente étude ont abouti à l'établissement d'un protocole efficace de micropropagation *in vitro* par culture des bourgeons axillaires du genre *Mentha*, avec la possibilité d'augmenter le rendement et/ou de diriger le profil chimique des HE pour une future utilisation commerciale.

Mots clés : *Mentha pulegium*, *Mentha rotundifolia*, micropropagation, huile essentielle, activité antioxydante, activité antimicrobienne.