

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits des
feuilles de *Mentha spicata L.***

Présenté par :

M^{elle} BOUZID Ouazna & M^{elle} OUAMARA Leila

Soutenu le Samedi 24 Juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme Ayouni K.

Melle Adrar S.

Mme Metrouh-Amir H.

MAA

MAB

MCB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, on aimerait remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

On voudrait témoigner notre reconnaissance à Melle Adrar S. pour avoir encadré ce mémoire. On la remercie particulièrement pour son souci de formation, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses encouragements, ses conseils et suggestions et tout ça dans la bonne humeur.

Nos remerciements :

Mme Ayouni K. pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire, et pour le temps qu'elle nous a bien voulu consacrer pour ce mémoire.

Mme Metrouch-Amir H. pour nous avoir fait l'honneur de juger ce modeste travail et de nous faire ainsi bénéficier de ses compétences.

Nous remercions également tous les étudiants de notre promotion en Pharmacologie Moléculaire.

Nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants rencontrés tout au long de nos années d'étude.

Dédicace

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce modeste travail :

A mes parents les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, qui ont été toujours là pour moi. J'espère que par ce travail, je vous rends un peu de sentiments et de fierté que j'éprouve d'être votre fille, « je vous aime ».

A ma très chère et unique sœur LAMIA ;

A mes très chers frères Adel et AYMEN ;

A notre promotrice Mlle ADRAR qui a été toujours avec nous ;

A toute la famille BOUZID et la famille IRZI.

*A mes amis : KATIA, TITI, MALIKA, HAMIDA, HAMZA, HANANE,
RACHIDA, KAHINA, SALIMA ET SIHAM.*

A ma chère collègue LEILA et sa famille.

A toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire «2016/2017» ;

A tous ceux qui ont été à mes côtés de près ou de loin.

Ouazna. B

Dédicace

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce modeste travail :

A mes parents les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, qui ont été toujours là pour moi. J'espère que par ce travail, je vous rends un peu de sentiments et de fierté que j'éprouve d'être votre fille, « je vous aime ».

A mes très chère sœurs ; Karima, Hassiba, Fatima ;

A mes très chers frères ; Yasmine, Dauod, Oualid ;

A notre promotrice Mlle ADRAR qui a été toujours avec nous ;

A toute la famille OUAMARA et la famille LAHBIB et THAKDMITH.

A mes amis : Cherifa, Samira, Selia, Hourya, Rahema, Marieme, Yamina, Bilel

A ma chère collègue Ouazna et sa famille.

A toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire «2016/2017» ;

A tous ceux qui ont été à mes côtés de près ou de loin.

Leila. O

Liste des abréviations

ABTS : 2, 2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphate.

ADN : Acide desoxyribo-nucléique.

AOX : Antioxydant.

BHA: Buty- hydroxyl- anisol.

DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl.

EAG : Equivalent acide gallique.

EC: Equivalent catéchine.

EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique.

EQ: Equivalent quercétine.

ERN: Espèce réactive d'azote.

ERO: Espèces réactives d'oxygène.

GPx: Glutathion peroxyde.

GSH: Glutathion avec la forme réduit.

GSSH: Glutathion disulfure.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50% .

Meⁿ⁺ : Ions métallique.

MPO: Myéloperoxydase.

SOD: Superoxyde dismutase.

Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
Tableau I	Taxonomie de <i>Mentha spicata L.</i>	3
Tableau II	Composition biochimique de <i>Mentha spicata L.</i> Algérienne	3
Tableau III	Espèces réactives de l'oxygène	6
Tableau IV	Classes des composés phénoliques	10

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
Figure 1	Photographies des différentes parties aériennes de <i>Mentha spicata L</i> (originale).	2
Figure 2	Formation des espèces réactives par divers processus.	6
Figure 3	Effets des espèces réactives sur l'organisme.	7
Figure 4	Les trois sites essentiels de flavonoïdes impliqués dans la chélation des ions métalliques.	12
Figure 5	Photographies des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> (originale).	13
Figure 6	Photographie de la poudre obtenir à partir des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> (originale).	13
Figure 7	Protocole appliqué pour l'extraction des composés phénoliques.	14
Figure 8	Protocole de dosage des phénols totaux.	15
Figure 9	Protocole de dosage des flavonoïdes.	16
Figure 10	Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés.	17
Figure 11	Protocole de dosage des tanins condensés.	17
Figure 12	Protocole de pouvoir réducteur des extraits de <i>Mentha spicata L</i> .	18
Figure 13	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	19
Figure 14	Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH.	20
Figure 15	Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de proton.	21
Figure 16	Protocole de l'activité scavenging du radical-cation ABTS ^{•+} .	22
Figure 17	Protocole de l'activité chélatrice du fer.	23
Figure 18	Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> .	24
Figure 19	Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> .	25
Figure 20	Teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> .	26
Figure 21	Représentation graphique pouvoir réducteur des différents extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> et de standard BHA.	27

Figure 22	Activité scavenging du radical DPPH' des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> et des standards (BHA et l'acide ascorbique).	29
Figure 23	Activité scavenging du radical DPPH' à différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>mentha spicata L</i> .	30
Figure 24	Activité scavenging de radical DPPH' à différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.	30
Figure 25	Activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+} par les extraits de <i>Mentha spicata L</i> .et des standards (Trolox).	31
Figure 26	Activité scavenging du radical ABTS ^{•+} à différents concentrations de l'extrait aqueux du Chloroforme de <i>Mentha Spicata L</i> .	32
Figure 27	Activité scavenging du radical ABTS ^{•+} à différentes concentrations de standard (Trolox).	32
Figure 28	Représentation graphique d'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata L</i> . et de standard EDTA.	33

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1-Mentha spicata L.

I-1-1-Définition 2

I-1-2-Description 2

I-1-3-Systématique 3

I-1-4-Composition chimique 3

I-1-5-Utilisation 4

I-1-6-Activités biologiques 4

I-2-Radicaux libres

I-2-1-Définition 5

I-2-2-Espèces réactives en biologie 5

I-2-3-Génération des espèces réactives 6

I-2-4-Stress oxydant 7

I-2-4-1-Conséquences du stress oxydant 7

I-3-Antioxydants

I-3-1-Définition 8

I-3-2-Types des antioxydants 8

I-3-2-1-Antioxydants enzymatiques 8

I-3-2-2-Antioxydants non enzymatiques 9

I-4-Composés phénoliques

I-4-1-Définition 9

I-4-2-Classification 9

I-4-3-Mécanisme d'action 11

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-1-Préparation de matériel végétal	13
II-1-1-Récolte de la plante	13
II-1-2-Séchage et broyage	13
II-2-Extractions des composés phénoliques	13
II-3-Dosage des composés phénoliques	15
II-3-1-Dosage des phénols totaux	15
II-3-2-Dosage des flavonoïdes	16
II-3-3-Dosage des proanthocyanidines	17
II-4-Activité antioxydante des extraits	18
II-4-1-Pouvoir réducteur du fer	18
II-4-2-Activité scavenging du radical DPPH [•]	19
II-4-3-Activité scavenging du radical-cation ABTS ^{•+}	21
II-4-4-Activité chélatrice du fer	22
II-5-Etude statistique	23

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1-Dosage des composés phénoliques	24
III-1-1-Dosage des phénols totaux	24
III-1-2-Dosage des flavonoïdes	25
III-1-3-Dosage des proanthocyanidines	26
III-2-Activité antioxydante	27
III-2-1-Pouvoir réducteur du fer	27
III-2-2-Activité scavenging du radical DPPH [•]	28
III-2-3-Activité scavenging du radical-cation ABTS ^{•+}	30
III-2-4-Activité chélatrice du fer	32
Conclusion	34
<i>Références bibliographiques</i>	35

Annexes

INTRODUCTION

L'oxygène est nécessaire à la vie des êtres vivants, pour la production de l'énergie. Mais cette production entraîne la formation des espèces réactives de l'oxygène qui sont beaucoup plus toxiques que l'oxygène lui-même (**Gardès-Albert, 2003**).

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les espèces radicalaires et les systèmes antioxydants (**Bonnefont-Rousselot, 2002**). Ce phénomène cellulaire est la cause principale de plusieurs maladies telles que : le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Favier et al., 2003**).

Les métabolites secondaires des plantes empêchent l'oxydation des molécules biologiques par les radicaux libres (**Berger, 2006**), en particulier, les composés phénoliques qui sont présents dans la quasi-totalité des plantes et sont retrouvés dans presque toutes les parties de la plante. Ces composés font l'objet de nombreuses études en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques et leur impact bénéfique sur la santé humaine (**Richard et al., 2010**).

Mentha spicata L est une plante médicinale qui appartient à la famille des Lamiacées, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies grâce à sa richesse en polyphénols (**Abootalebian et al., 2016**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des feuilles de *Mentha spicata L*.

- Le premier chapitre de ce document est consacré à une synthèse bibliographique sur *Mentha spicata L*, ainsi qu'un aperçu général sur les radicaux libres et les antioxydants et aussi les polyphénols.
- Le deuxième chapitre est consacré à la partie expérimentale, à savoir :
 - Extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Mentha spicata L* ;
 - Dosages des composés phénoliques de ces extraits ;
 - Evaluation de leur activité antioxydante.
- La troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Chapitre I

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

I-1- *Mentha spicata* L.

I-1-1-Définition

Mentha spicata L. est une herbe aromatique qui appartient à la famille des lamiacées (Abootalebian et al., 2016), ces dernières sont très homogènes et faciles à identifier (Brahmi, 2016). Son nom vernaculaire en arabe «Naànaa», en anglais «spearmint» (Zekri, 2016), et en français «menthe verte». *Mentha spicata* L. pousse spontanément dans les zones tempérées et elle est cultivée partout dans le monde (Laggoune et al., 2016).

I-1-2-Description

Mentha spicata L est une plante vivace et rampante (Bremness, 2011). Elle se caractérise par une tige carrée droite et verte, qui ne dépasse pas plus d'un mètre de longueur, ses feuilles sont d'un vert foncé, opposées, sessiles, subsessiles, allongées à ovales ou lancéolées de 5 à 9 cm de longueur et de 1.5 à 3 cm de largeur (Sennoussi, 2015), ses fleurs comportent un calice en forme de clochette; glabre ou cilié, divisé en 5 dents, une corolle violette pale, rose ou blanche, 4 étamines saillantes de taille identiques, un ovaire super, divisé en deux loges renfermant chacune deux ovules (Brahmi, 2016) (Figure1).



Figure1 : Photographies des parties aériennes de *Mentha spicata* L (originales).

I-1-3- Systématique

Le tableau suivant représente la systématique de *Mentha spicata L.*

Tableau I : Taxonomie de *Mentha spicata L* (Moon et al., 2009 ; Lansdown, 2014).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantea
Sous règne	Trachéophytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Sous-tribu	Menthinae I
Genre	<i>Mentha.</i>
Espèce	<i>Mentha spicata L.</i>

I-1-4-Composition biochimique

Le tableau suivant montre la composition biochimique de *Mentha spicata L.* Algérienne

Tableau II: Composition biochimique de *Mentha spicata L.* Algérienne (Brahmi et al., 2016).

Les huiles essentielles	
Carvone , limonene, 1.8-cineole, β -Caryophyllene germacrene D.	
Composés phénoliques	
Acides phénoliques :	Acide 4-hydroxy benzoïque, Acide caféique, Acide α -coumarique, Acide chlorogénique et Acide rosmarinique.
Flavonoïdes :	rutine, naringenine, luteoline, diosmine, kaempferole et diosmetine.
Autre composés	
Esters méthilique d'acide gras, triglycéride, squalène, stigmastérol, Sitostérol, acide oléanolique, ursolique et pomolique Caroténoïdes, alcaloïde, saponine.	

I-1-5-Utilisations

Mentha spicata L est la plus ancienne herbe médicinale (Nanekarani et al., 2012). Grâce à ses propriétés thérapeutiques (antifongique, antivirale, antimicrobienne, insecticide, antioxydante...) (Almeida et al., 2012), les feuilles de cette plante ont été utilisées traditionnellement pour le traitement de plusieurs maladies (rhume, spasmes, crampes, troubles digestives, fièvre, maux de tête, bronchite, nausée, rhumatisme, troubles gastro-intestinaux, douleurs des dents). L'huile de cette menthe est utilisée comme un arôme dans des dentifrices, chewing-gum, savons et aussi dans des soupes, parfumeries, détergents, pesticides (Soysal, 2005 ; Brahmi et al., 2012).

I-1-6-Activités biologiques

Divers études ont montré que *Mentha spicata L* possède plusieurs activités biologiques, grâce à leur richesse en composés phénoliques et en huiles essentielles (Bagheri et al., 2014 ; Abootalebian, 2016 ; Alaei et al., 2016).

➤ Activité antioxydante

Brahmi et al., (2015) ont démontré *in vitro* que l'extrait éthanolique des feuilles de *Mentha spicata L* est un très bon scavenger du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ($IC_{50}=16,2 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$).

➤ Activité antibactérienne

Barchan et al. (2015) ont démontré par la technique de diffusion en puits que les souches *Listeria monocytogenes* 4031, *Enterococcus hirae* 4081, *Staphylococcus aureus* 976 sont sensibles vis-à-vis des extraits méthanoliques des feuilles de *Mentha spicata L* avec des diamètres supérieurs à 12 mm.

➤ Activité cytotoxique

L'extrait aqueux des feuilles de *Mentha spicata L* a des effets cytotoxiques, sur les deux cellules tumorales fibrosarcome (Wehi-164) et monocyte leucémie (U937), qui ont été évalués *in vitro* (Hajighasemi et al., 2011).

➤ Activité insecticide

Teixeira et al. (2014) ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Mentha spicata* L. est considérée comme une source alternative pour la gestion des insectes.

I-2-Radicaux libres

I-2-1- Définition

Un radical libre est une espèce chimique, ayant un électron célibataire sur la couche externe, ce qui le rend instable et capable de réagir avec d'autres molécules (**Carrière et al., 2006**). Il est caractérisé par un temps de demi-vie extrêmement court (10^{-9} - 10^{-3} s). Il peut se former soit par la réaction redox (gain ou perte d'un ou de plusieurs électrons), soit par la fission homolytique (rupture de la liaison covalente par laquelle chaque atome possède un électron) (**Koechlin-Ramonatx, 2006**).

I-2-2- Les espèces réactives en biologie

Dans le domaine de la biologie, les espèces réactives les plus importantes sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives du nitrogène (ERN) (**Vergely et al., 2003**). Les ERO possèdent des propriétés physiologiques lorsqu'elles sont produites en faibles concentrations : elles jouent un rôle dans l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**). Elles participent aussi à plusieurs fonctions (phagocytose, signalisation cellulaire, fécondation de l'ovule) (**Haleng et al., 2007**). Les ERO jouent ainsi un rôle dans le contrôle de processus cellulaires physiologiques (croissance, sénescence, apoptose ou survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses).

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle important dans la vasodilatation endothéliale (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**), mais dans le cas d'une production élevée, provoque des dommages dans l'organisme (**Valko et al., 2007**).

Les radicaux libres et leurs dérivés sont souvent nommés sous le terme « espèces réactives de l'oxygène » (ERO), les plus courantes sont résumées dans le Tableau III.

Tableau III : Espèces réactives de l'oxygène (Ré et al., 2005).

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) « peu réactif »	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) « peu réactif »
Radical hydroxyle (OH^{\cdot}) « très réactif »	Peroxynitrite ($ONOO^-$) « très réactif »
Monoxyde d'azote (ON^{\cdot}) « peu réactif »	

I-2-3-Génération des espèces réactives

Les espèces réactives sont produites principalement par deux sources:

- Exogène : métaux toxiques, tabac, la pollution atmosphérique, les rayonnements UV ou des carences nutritionnelles (Favier, 2003 ; Paul et Ifran, 2006).
- Endogène : Les ERO peuvent se générer par plusieurs réactions chimiques (la chaîne respiratoire mitochondriale, xanthine/hypoxanthine, NADPH-oxydase, NO synthase) (Paul et Ifran, 2006) (Figure 2).

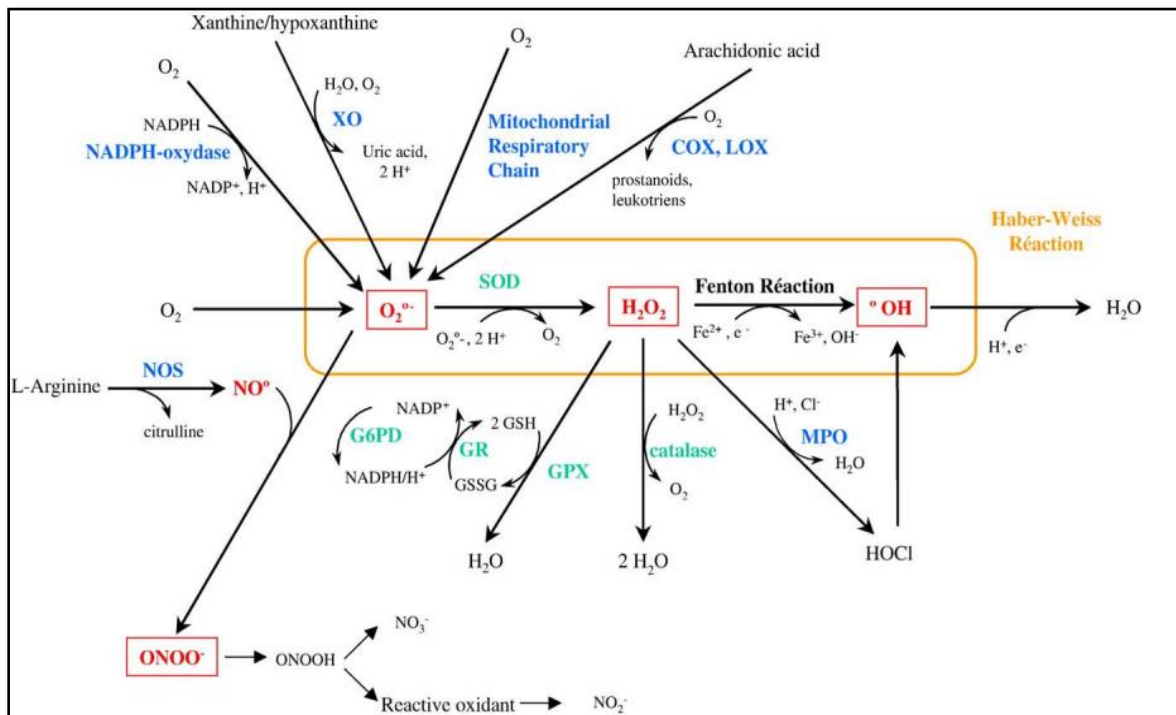


Figure 2 : Formation des espèces réactives par divers processus (Margaill et al., 2005).

I-2-4- Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants, dû soit à la défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru (Berger, 2006).

I-2-4-1-Conséquences du stress oxydant

La surproduction des radicaux libres provoquent des lésions au niveau des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, lipides, protéines) qui conduisent à un dysfonctionnement cellulaire (Figure 3) (Alain, 2003).

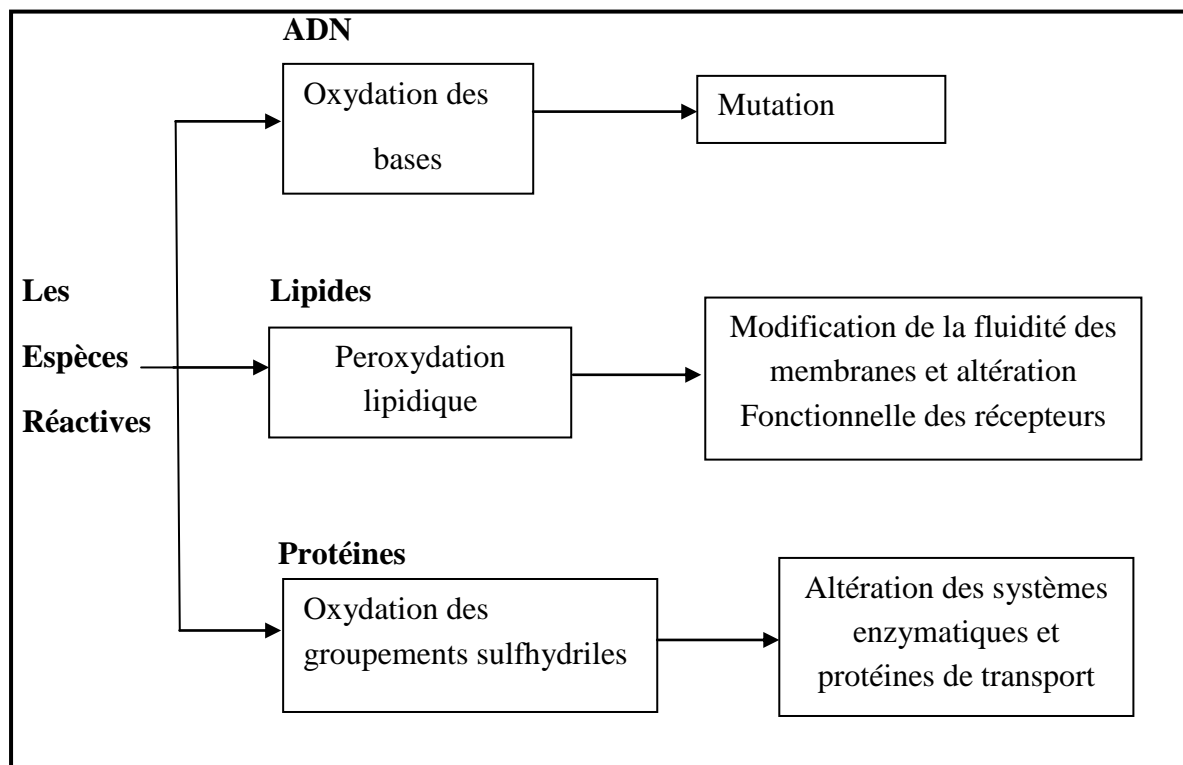


Figure 3 : Effets des espèces réactives sur l'organisme (Favier, 2003).

Le stress oxydatif est lié à plusieurs pathologies telles que : vieillissement, cancer, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, diabète, ostéoporose, arthrose, cataracte, athérosclérose (Scalbert et Faradet, 2006).

I-3-Antioxydants

I-3-1-Définition

Un antioxydant (AOX) est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat (Berger, 2006).

I-3-2- Types des antioxydants

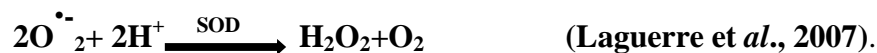
I-3-2-1-Antioxydants enzymatiques

Ils sont considérés comme une véritable arme naturelle fabriquée par notre organisme, ils ont chacun leur lieu et mode d'action.

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

C'est une enzyme essentielle, que tout organisme vivant fabrique naturellement, elle est la clef de voûte du système de défense antioxydant (Desbordes, 2008). Elle est localisée dans la mitochondrie ou dans le cytosol ; elle agit par trois iso-enzymes polypeptidiques constituées par une chaîne d'acides aminés renfermant deux atomes métallique : zinc et cuivre (Cu/Zn-SOD), 2 atomes de fer (Fe-SOD) ou 2 atomes de manganèse (M-SOD) (Amar, 2010).

La SOD catalyse la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en dioxygène et H_2O_2 selon la formule :



- **Glutathion peroxydase (GPx)**

La GPx est un tétramère composé de quatre chaînes polypeptiques simples synthétisées au niveau rénal et hépatique. Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultants de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Haleng et al., 2007).



- **Catalase :**

Le rôle de la catalase est de canaliser la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Griveau *et al.*, 1995), selon la réaction suivante :



I-3-2-2-Antioxydants non enzymatiques

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants, dont leur efficacité est plus reconnue dans l'industrie agroalimentaire que dans la santé humaine (Brahmi, 2016).

Ce sont des antioxydants, plus communément appelés des « piègeurs » de radicaux libres, endogènes ou exogènes. Ils sont susceptibles de neutraliser les radicaux libres et de ralentir la propagation des réactions d'oxydation. Ils sont à la fois cytosoliques et membranaires.

Ils renferment principalement : L- α -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion réduit (GSH) ainsi que des antioxydants exogènes comme les polyphénols, qui sont les composés les plus utilisés contre les stress oxydatif (Griveau *et al.*, 1995).

I-4- Composés phénoliques

I-4-1-Définition

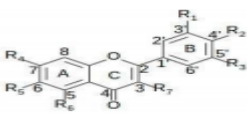
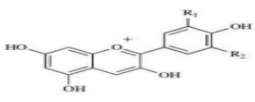
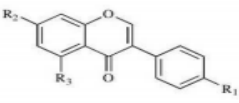
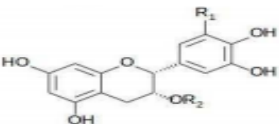
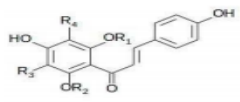
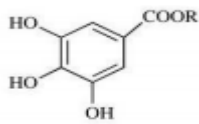
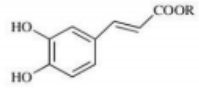
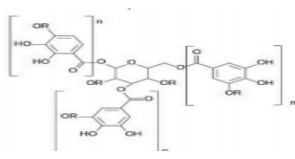
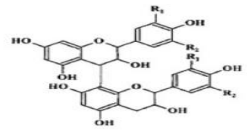
Les composés phénoliques ou polyphénols sont des molécules organiques caractérisées par la présence d'un cycle aromatique pourtant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Ignat *et al.*, 2011) .

Ils sont impliqués dans diverses activités physiologiques et écologiques et ils ont un rôle dans la lutte contre diverses maladies (cardiovasculaires, inflammatoires, cancéreuses et diabète, etc.) (Khoddami *et al.*, 2013).

I-4-2-Classification

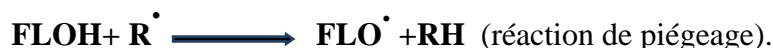
Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes, en se basant sur la complexité du squelette de base et sur les liaisons possibles de ce squelette avec d'autres molécules (Tableau 4) (Sarni-Manchado *et Chernier*, 2006).

Tableau IV: Classes des composés phénoliques. (Ignat *et al.*, 2011 ; Mojzer *et al.*, 2016).

Classe	Sous-classe	Structure	Référence
Flavonoïdes	Flavonols		(Mojzet <i>et al.</i> , 2016)
	Flavones		
	Flavonones		
	Anthocyanidines		
	Isoflavones		
	Catéchines		
	Chalcones		
Acides phénoliques	Acides Hydroxybenzoïques		(Mojzer <i>et al.</i> , 2016)
	Acides hydroxycinnamiques		
Tannins	Tannins hydrolysables		(Ignat <i>et al.</i> , 2011)
	Tanins condensés		

I-4-3-Mécanismes d'action des composés phénoliques :**➤ Piégeage des radicaux libres :**

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux moins réactifs (flavoxyles), selon la réaction suivante :



Le radical (FLO[•]) formé va subir des transformations au niveau de sa structure par résonance ; redistribution des électrons impaire sur le noyau aromatique pour donner des molécules moins réactives par rapport au R[•] ; d'autre part les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (**Dorman et al., 2003**).

Les tannins agissent comme donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation, les radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique (**Igor-Passi, 2003**).

Les acides phénoliques possèdent également des activités anti-oxydantes et anti-radicalaires, ainsi l'acide caféique et l'acide gallique captent *in vivo* les radicaux super oxydés produits par le système NADPH/ methosulfate et captent aussi le radical DPPH *in vitro* (**Ravisi et al, 1979**).

➤ Chélation des métaux de transition :

Les flavonoïdes sont capables de chélater les ions métalliques par trois sites essentiels qui sont situés entre :

- Le groupe 3-hydroxyle (3'OH) et 4-hydroxyle (4'OH) du cycle B.
- Le groupe 3-hydroxyle et 4-oxo dans le cycle hétérocyclique.
- Le groupe 4-oxo de hétérocyclique et 5-hydroxyle de cycle A. (Figure 4)

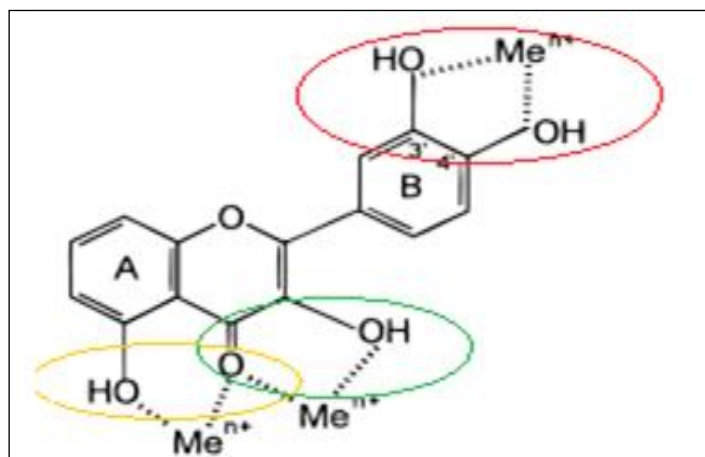


Figure 4: Les trois sites essentiels de flavonoïdes impliqués dans la chélation des ions métalliques (Pietta, 2000).

➤ **Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres**

Les flavonoïdes inhibent plusieurs enzymes responsables de la production d'anion superoxyde et d'autre ERO, telles que : la xanthine oxydase, protéine kinase C, cyclooxygenase, lipoxygenase, monooxygenase microsomale, glutathion S-transférase, succinoxydase mitochondriale et NADH oxydase (Pietta, 2000).

Chapitre II

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

II-1-Préparation du matériel végétal

L'étude expérimentale a été réalisée sur les feuilles de *Mentha spicata L.*

II-1-1-Récolte de la plante

Mentha spicata L a été récoltée en mars 2017 dans la région de Beni-Maouche de la wilaya de Bejaia.



Figure 5 : Photographie des feuilles de *Mentha spicata L* (originale).

II-1-2-Séchage et broyage et tamisage

Les feuilles de *Mentha spicata L* ont été lavées afin d'éliminer les poussières et les impuretés, puis séchées à l'air libre (à l'ombre) pendant une semaine et 24h à l'étuve à 40°C et par la suite broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine ($<125\mu\text{m}$) (figure 2).

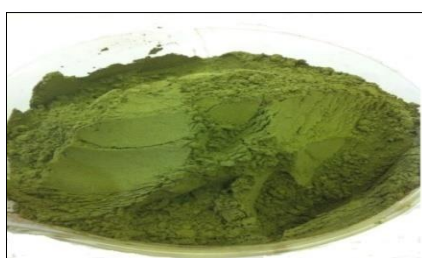


Figure 6 : Photographie de la poudre obtenue à partir des feuilles de *Mentha spicata L.* (originale).

II-2-Extraction des composés phénoliques

La préparation des extraits a été réalisée selon la méthode de **Chiang et al., (1994)** avec des modifications. Elle se base sur l'extraction sélective des composés phénoliques en

utilisant trois solvants de différentes polarités : l'éthanol, chloroforme, l'eau. Toutes les opérations d'extraction ont été effectuées à des températures ambiantes.

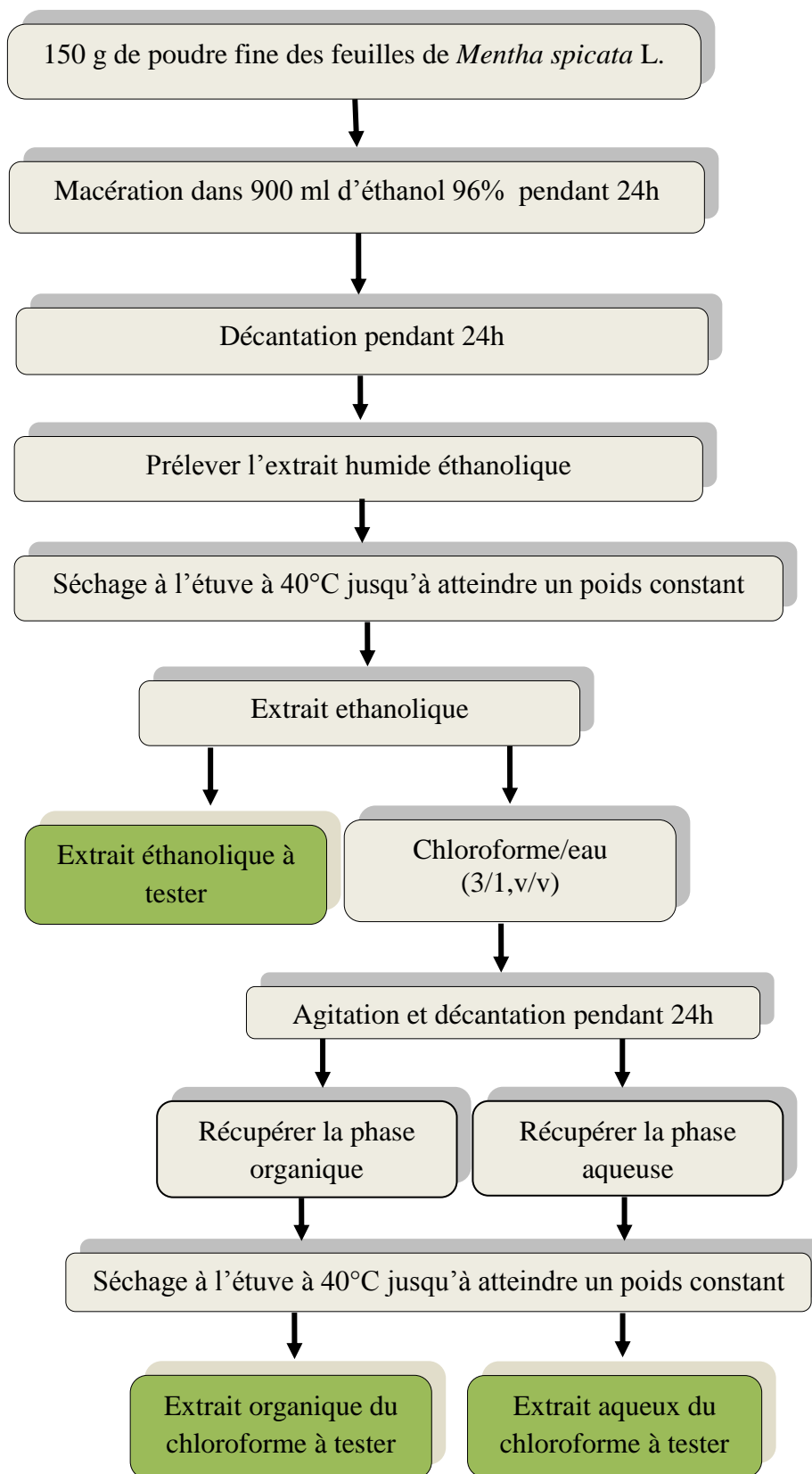


Figure 7: Protocole appliqué pour l'extraction des composés phénoliques.

II-3-Dosage des composés phénoliques

Dans le but de déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits des feuilles de *Mentha spicata L*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines.

II-3-1-Dosage des phénols totaux

Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu qui est constitué d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction du réactif par des composés phénoliques en milieu alcalin, qui entraîne la formation d'un mélange de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleu, dont l'absorption maximale à 765 nm est proportionnelle aux taux de polyphénols présents dans l'extrait (**Enneb et al., 2015**).

La teneur en phénols totaux a été déterminée avec le spectrophotomètre UV-visible par la méthode de **Yap et al. (2009)**, avec quelques modifications (Figure 8).

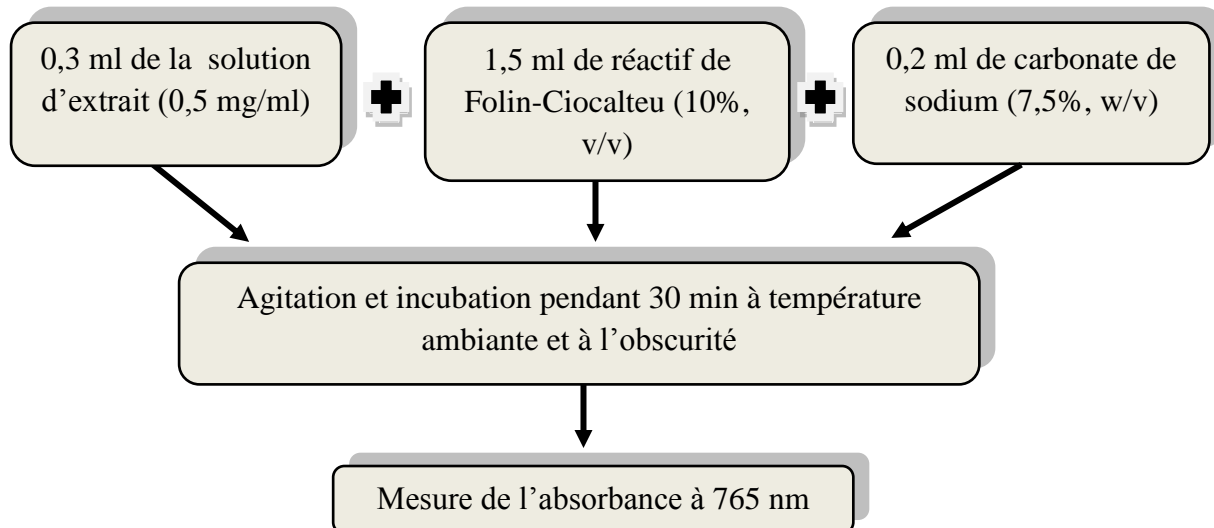


Figure 8 : Protocole de dosage des phénols totaux (**Yap et al., 2009**)

-Un blanc a été préparé en mélangeant 0,3 ml de méthanol avec 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 0,2 ml de carbonate de sodium.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique / g d'extrait (Annexe 8).

II-3-2-Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes repose sur la formation d'un complexe jaunâtre aluminium-flavonoïde par chélation des métaux (fer et aluminium) en présence des groupements hydroxyles libres (Ribéreau-Gayon, 1968).

La teneur en flavonoïdes a été effectuée par la méthode adoptée par Mimica-Dukic, (1992) in Abadou Bouda et al. (2010), avec quelques modifications (figure 9).

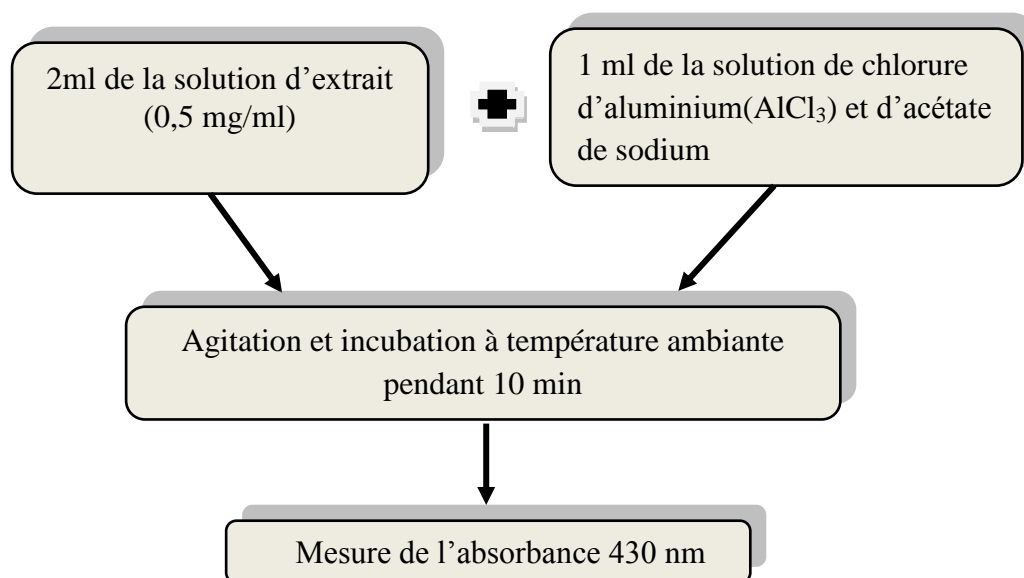


Figure 9: Protocole de dosage des flavonoïdes (Abdou Bouda et al., 2010).

- Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 2 ml de la solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

La concentration en flavonoïde est déterminée en référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations de quercétine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine / g d'extrait (Annexe 8).

II-3-3-Dosage des proanthocyanidines (tanins condensés)

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les premières unités des tanins condensés en présence d'acide, qui entraîne la formation d'un complexe coloré mesuré à 500 nm (Ba *et al.*, 2010) (Figure 10).

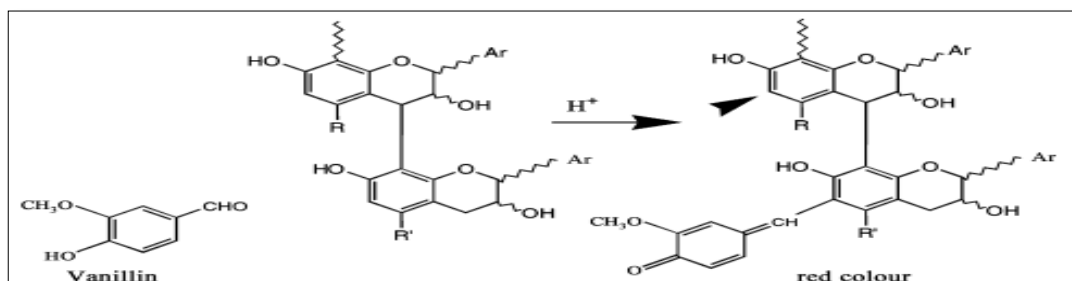


Figure 10 : Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés

(Schofield *et al.*, 2001).

La teneur en tanins condensés a été effectuée selon la méthode décrite par (Sun *et al.*, 1998) in Oyedimi et Afolayan, (2011), avec quelques modifications (Figure 11).

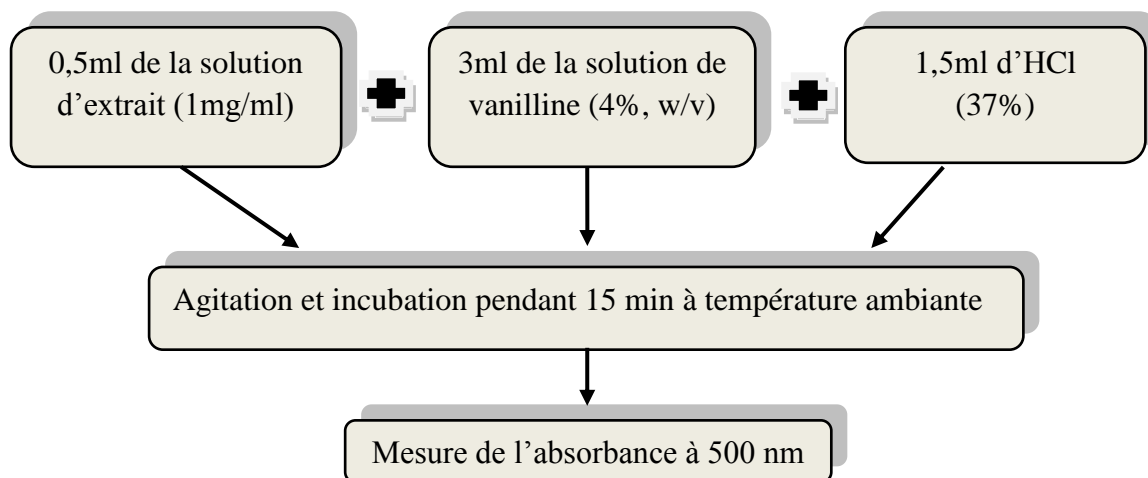


Figure 11: Protocole de dosage des tanins condensés (Oyedim et Afolayan, 2001).

- Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0,5ml de la solution d'extrait avec 3ml de méthanol et 1,5ml d'HCl.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent catéchine / g d'extrait (Annexe 8).

II-4-Activité antioxydant des extraits

L'activité antioxydant a été mesurée en testant le pouvoir réducteur, l'activité scavenging des radicaux DPPH', ABTS^{•+} et l'activité chélatrice du fer.

II-4-1-Pouvoir réducteur

Ce protocole est basé sur l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réagir avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former le ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}), qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique (FeCl_3) pour donner un complexe ferrique ferreux d'une couleur bleu mesurable à 700 nm. Qui se traduit à la présence de groupements hydroxyles qui peuvent servir comme donneur d'électron (**Jayanthi et Lalitha, 2011 ; Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

Le pouvoir réducteur des différents extraits de *Mentha spicata L* a été déterminé selon le protocole d'Oyaizu (1986) in Ogunlana et Ogunlana, (2008) avec quelques modifications (Figure 12).

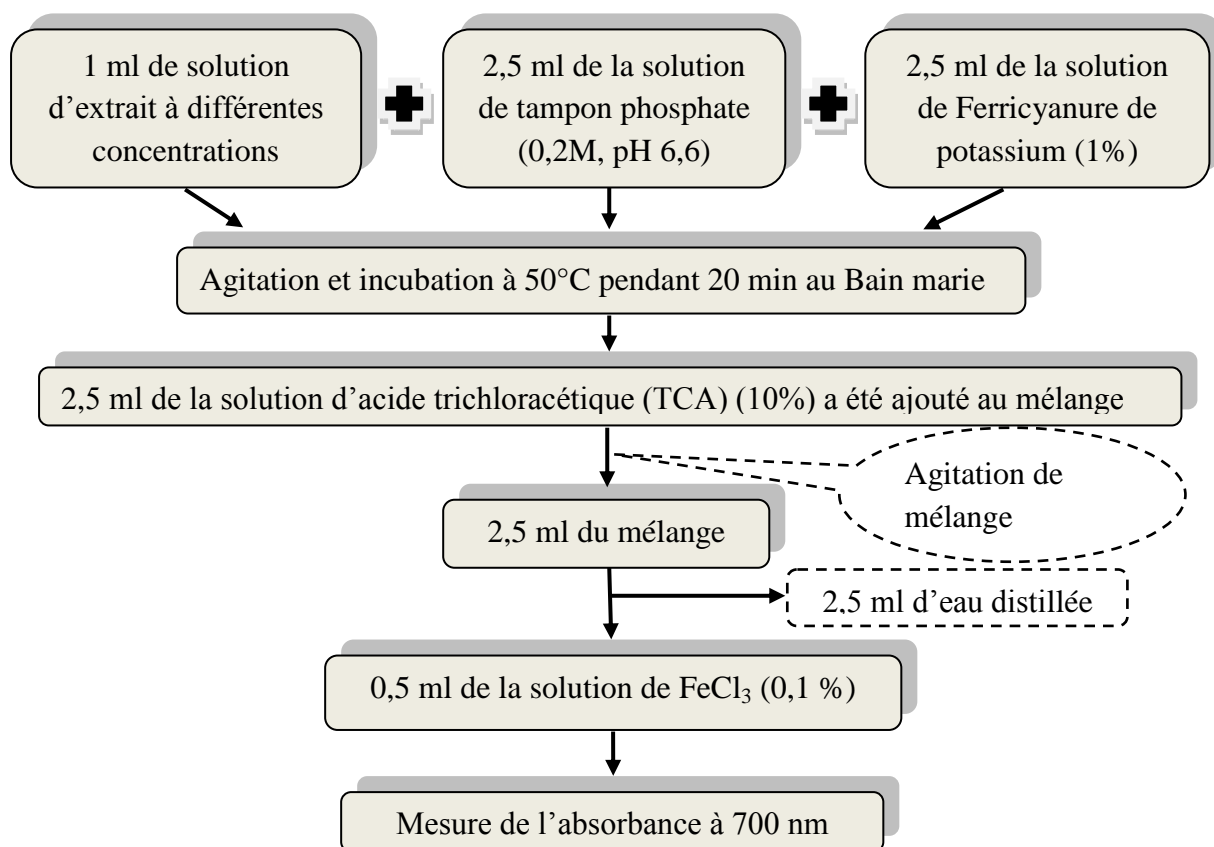


Figure 12 : Protocole de pouvoir réducteur des extraits de *Mentha spicata L* (Oyaizu, 1986).

-Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol.

-Le BHA a été utilisée comme standard et à une concentration (0,1mg/ml).

Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance pour chaque concentration.

Le pouvoir réducteur des extraits augmente avec l'augmentation de l'absorbance.

II-4-2-Activité scavenging du radical DPPH[•]

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) est un radical libre de couleur violette, en présence des piègeurs des radicaux libres se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (figure 13) (Athmena et al., 2010).

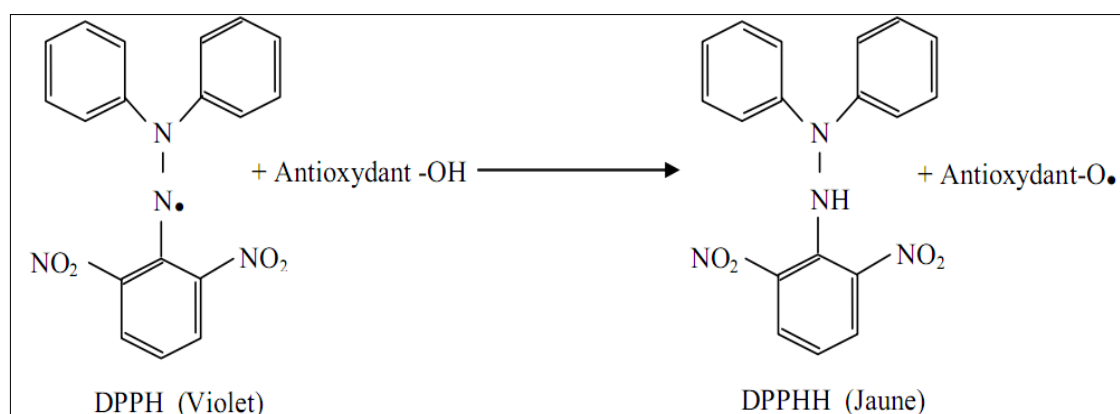


Figure13 :Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Talbi et al., 2015).

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Mentha spicata L* a été mesurée via le test DPPH[•], en suivant le protocole de Hamalatha et al. (2010) (Figure14).

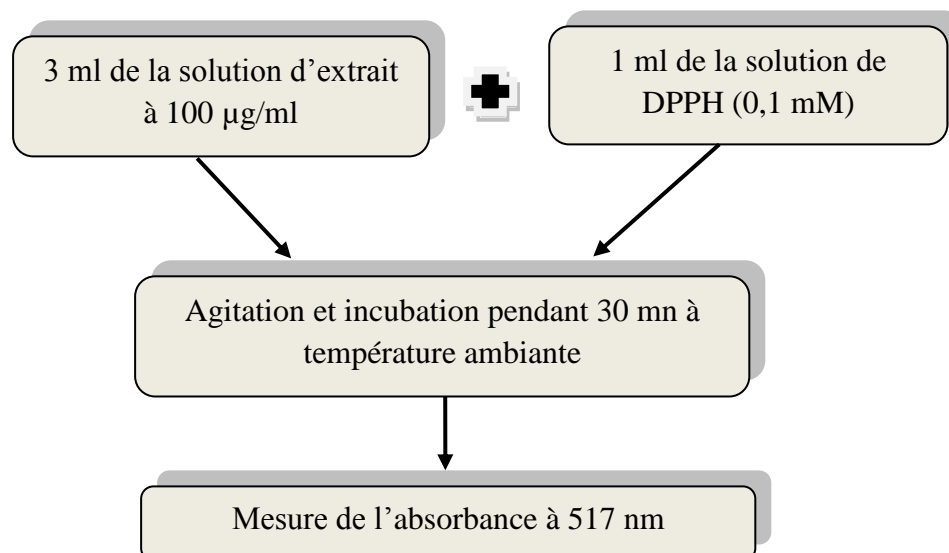


Figure 14 : Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH' (Hamalatha *et al.*, 2010).

-Un contrôle (blanc général) a été préparé en mélangeant 3 ml de méthanol avec 1 ml de DPPH.

-Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 3 ml de la solution d'extrait avec 1 ml de méthanol.

-L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations.

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH' de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH}' = [(A_C - (A_T - A_E)) / A_C] \times 100$$

Où :

- A_C : Absorbance de la solution du DPPH seulement.

- A_T : Absorbance de la solution de DPPH avec l'extrait.

- A_E : Absorbance de la solution d'extrait seulement.

II-4-3-Activité scavenging du radical-cation $ABTS^{+\cdot}$

L'ABTS⁺ (2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphate) est un radical libre de coloration bleu-vert, il se réduit en ABTS d'une coloration transparente par piégeage d'un proton par l'antioxydant (Figure 15) (Yu, 2008).

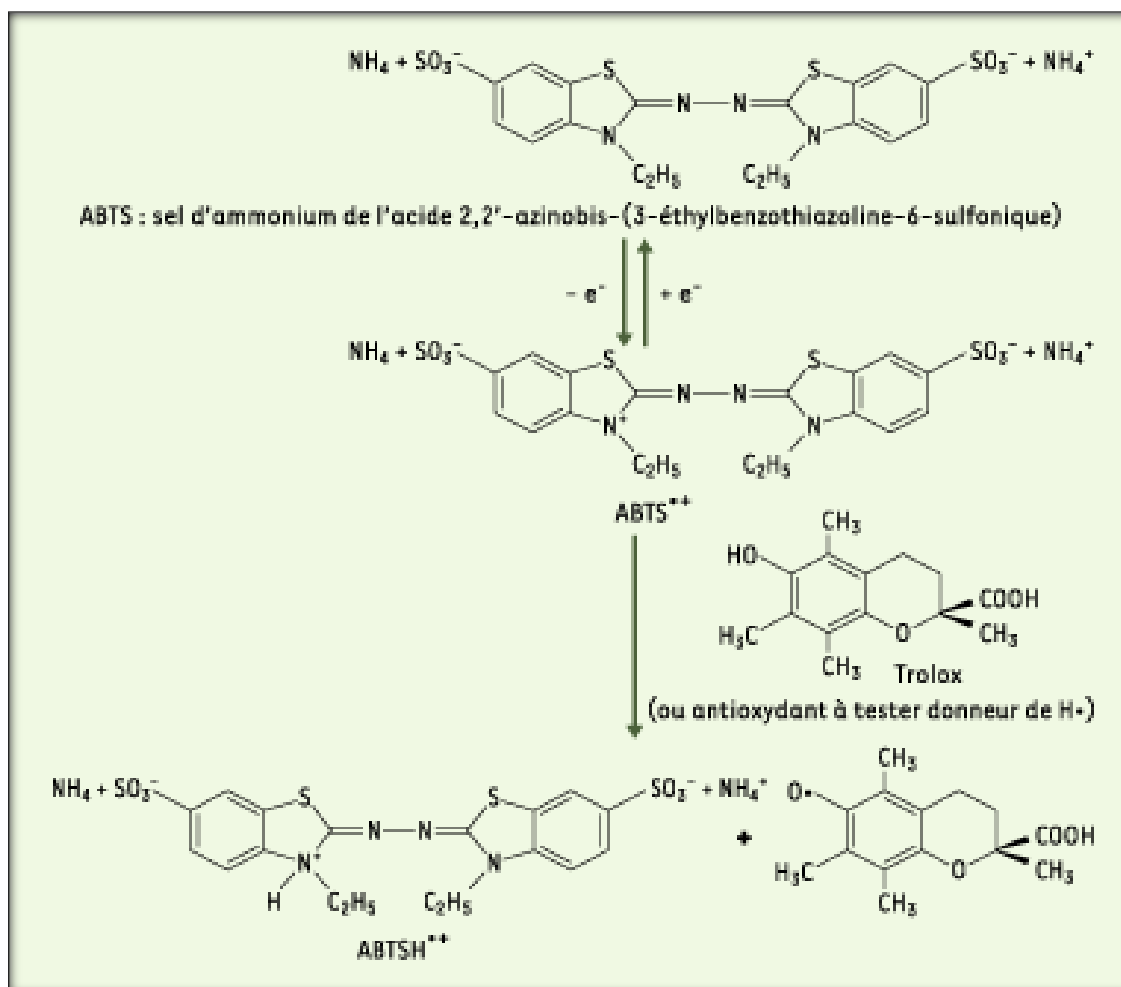


Figure 15: Formation et piégeage du radical $ABTS^{+\cdot}$ par un antioxydant donneur de proton (Marc *et al.*, 2004).

Activité scavenging du radical $ABTS^{+\cdot}$ des différents extraits de *Mentha spicata* L a été mesurée selon le protocole Le *et al.* (2007), avec quelques modifications (Figure 16).

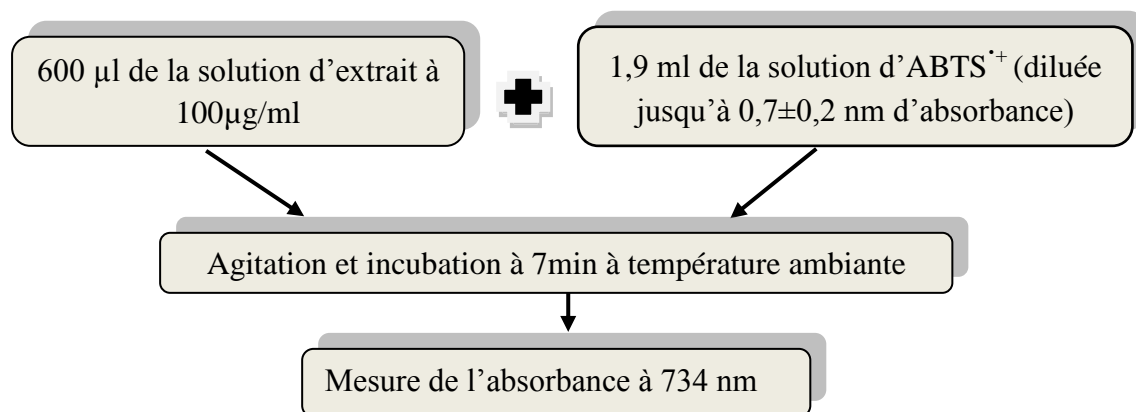


Figure 16 : Protocole de l'activité scavenging du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ (Le et al., 2007).

- Le contrôle a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

-Le Trolox a été utilisé comme standard et à différentes concentrations.

Le pourcentage de l'activité scavenging de l' $ABTS^{\bullet+}$ de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging de l' } ABTS^{\bullet+} = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

Où:

- A_C : Absorbance du contrôle .

- A_T : Absorbance du test.

IV-4-Activité chélatrice du fer

Le composé stable le plus utilisé est la férrozine, ce dernier forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe ferrozine- Fe^{2+} de couleur violette intense. La quantification de ce complexe est à 562 nm (Khadhri et al., 2012).

La capacité chélatrice des différents extraits de *Mentha spicata L* a été déterminée selon le protocole Dinis et al. (1994), avec quelques modifications (Figure 17).

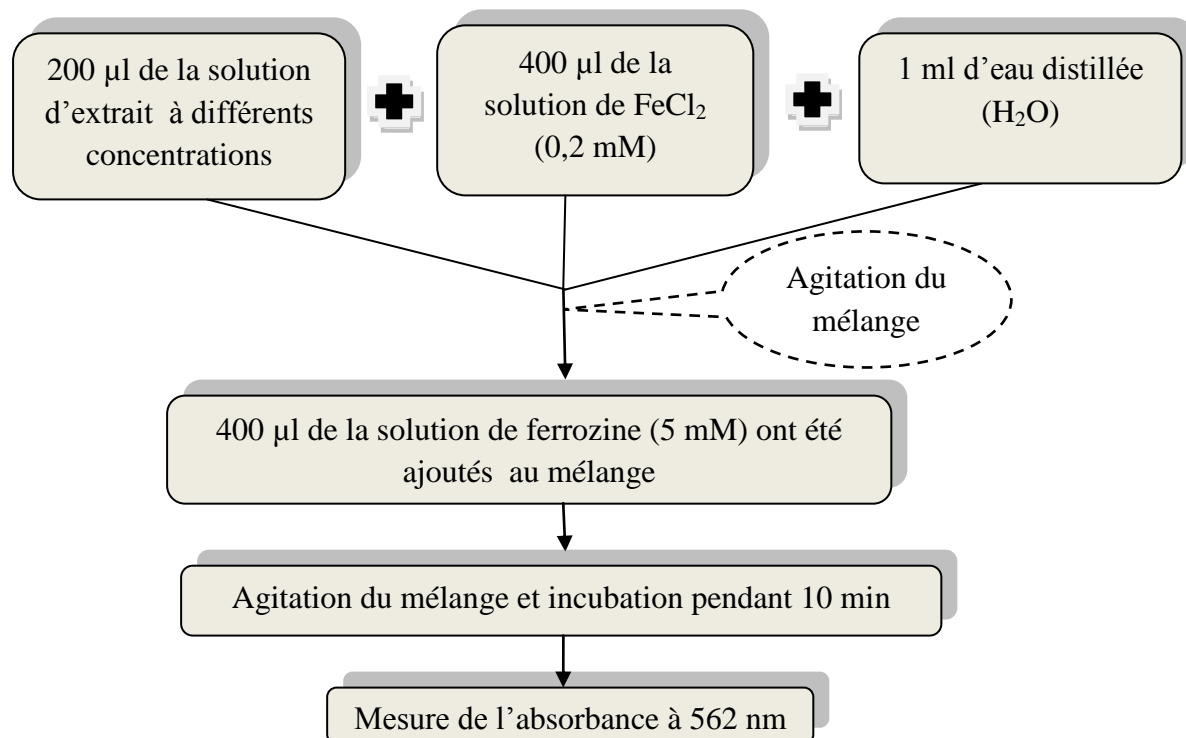


Figure 17 : Protocole de l'activité chélatrice du fer (Dinis *et al.*, 1994).

- Un contrôle a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.
- Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1,8 ml d'eau distillée avec 200 µl de la solution d'extrait.
- L'EDTA a été utilisée comme un standard et à une concentration (0,1mg/ml).

Le pourcentage de chélation du fer de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de chélation} = \frac{A_C (A_T - A_E)}{A_C} \times 100$$

Où :

A_C : Absorbance du contrôle. A_T : Absorbance du test. A_E : Absorbance de l'extrait.

V-Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écart type. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le test ANOVA. Les différences ont été considérées significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 8.

Chapitre III

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

III-1- Dosage des composés phénoliques

III-1-1- Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.*, exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec, sont représentées dans la figure ci-dessous :

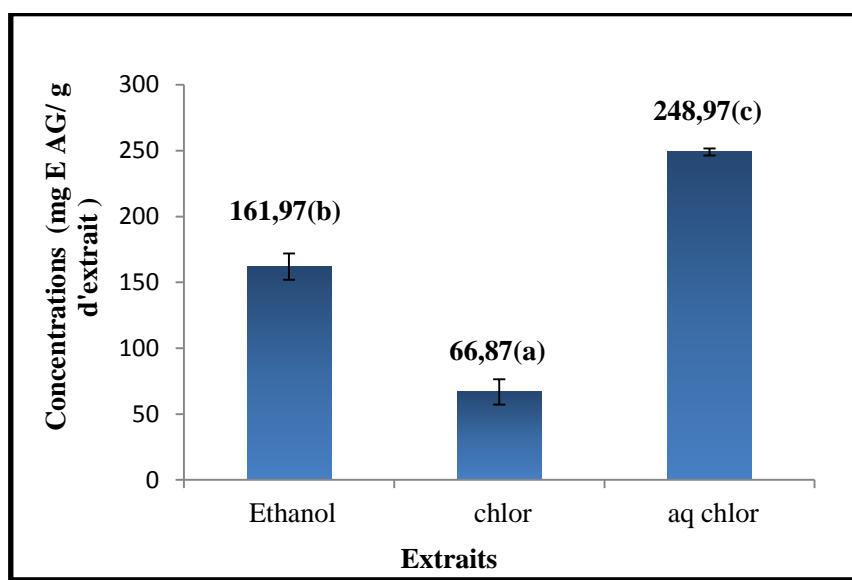


Figure 18 : Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.*

chlor : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre que les tenures en phénols totaux des différentes extraits ont présenté des différences significatives ($\alpha < 0,05$) (figure 18).

Les teneurs les plus élevée ont été présentées par aqueux chloroforme $248,97 \pm 2,69$ mg EAG/g d'extrait, suivi par l'extrait éthanologique $161,97 \pm 10,04$ mg EAG/g d'extrait et enfin l'extrait du chloroforme $66,87 \pm 9,62$ mg EAG/g d'extrait.

Une autre étude a été effectuée par **Dorman et al. (2003)**, ont montré que l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*, a donné une valeur 214 mg EAG/g d'extrait proche à celle obtenue dans notre étude qui est de 248,97 mg EAG/g d'extrait.

On remarque que la teneur en phénols totaux dans l'extrait aqueux chloroforme $248,97 \pm 2,69$ mg EAG/g d'extrait a donné plus que l'extrait chloroforme $66,87 \pm 9,62$ mg EAG/g d'extrait, cela semble évident étant donné que les polyphénols constituent des

composés polaires grâce à leur groupements hydroxyles, donc sont solubles dans les solvants polaires (Ignat *et al.*, 2011) .

Il est à signaler que la teneur en phénols totaux dans l'extrait éthanolique $161,97 \pm 10,04$ mg EAG/g d'extrait sec est moins significative par rapport à l'extrait aqueux $248,97 \pm 2,69$ mg EAG/g d'extrait sec, cela serait dû au fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du Folin-Ciocalteu dans l'extrait brut car il y aurait un encombrement stérique engendré par les macromolécules (lipide, protéine).

III-1-2-Dosage des flavonoïdes

Les résultats de dosage des flavonoïdes des extraits des feuilles de *Mentha spicata* L., exprimées en mg équivalent quercétine/ g d'extrait sec, sont représentés dans la figure ci-dessous :

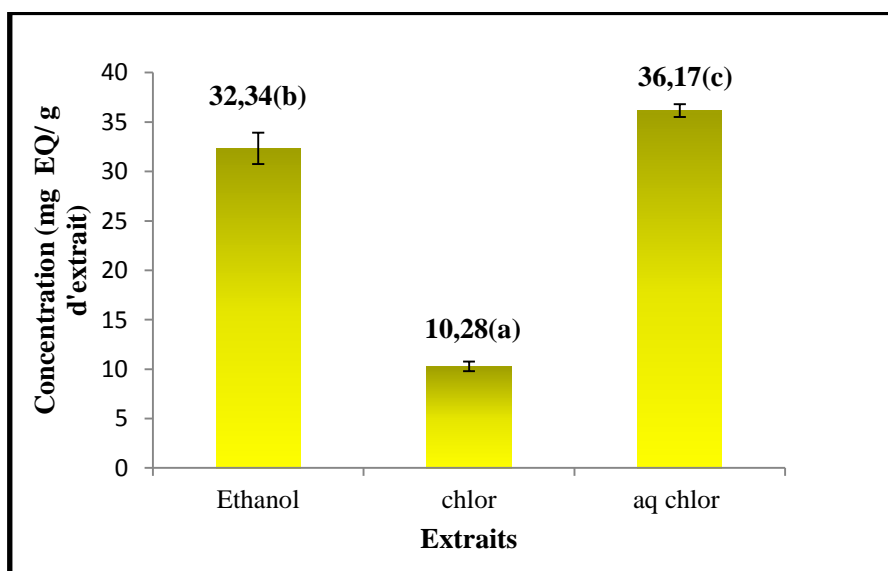


Figure 19: Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de *Mentha spicata* L.

chlo : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre que les tenures en flavonoïdes des différents extraits ont présenté des différences significatives ($\alpha < 0,05$) (figure 19). En effet, les teneurs les plus élevées ont été présentées par l'extrait aqueux chloroforme ($36,17 \pm 0,64$ mg équivalent quercétine /g d'extrait), suivi par l'extrait éthanolique ($32,34 \pm 1,57$ mg /g d'extrait) et enfin l'extrait chloroforme ($10,28 \pm 0,48$ mg EQ / g d'extrait).

Comparés au résultat obtenu par Sweetie *et al.*, 2007 qui est de $13,5 \pm 1,18$ mg, cette valeur est voisine à celle obtenue par notre étude $36,17 \pm 0,64$.

Nous constatons que le taux le plus élevé a été obtenu par l'extrait aqueux chloroforme $36,17 \pm 0,64$ mg EQ/ g d'extrait par rapport à l'extrait organique chloroforme $10,28 \pm 0,48$ mg EQ/g d'extrait, cela serait dû au fait que les flavonoïdes sont de très petites molécules très polaires, résultant de leur richesse en groupements hydroxyles, donc se solubilisent dans les solvants polaires (Bimakr et al., 2011 ; Pietta, 2000).

La concentration en flavonoïdes d'extrait éthanolique est moins significative à celle de l'extrait aqueux du chloroforme, cela serait aussi dû à la présence de plusieurs composés dans l'extrait éthanolique brut qui engendrait un encombrement stérique et empêcherait ainsi la formation du complexe entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et le Al^{+3} du chlorure d'aluminium, d'où la diminution de l'absorbance à 430 nm.

III-1-3-Dosage des proanthocyanidines

Les contenus en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.*, exprimés en mg équivalent catéchine (EC) / g d'extrait sec, sont représentés dans la figure ci-dessous :

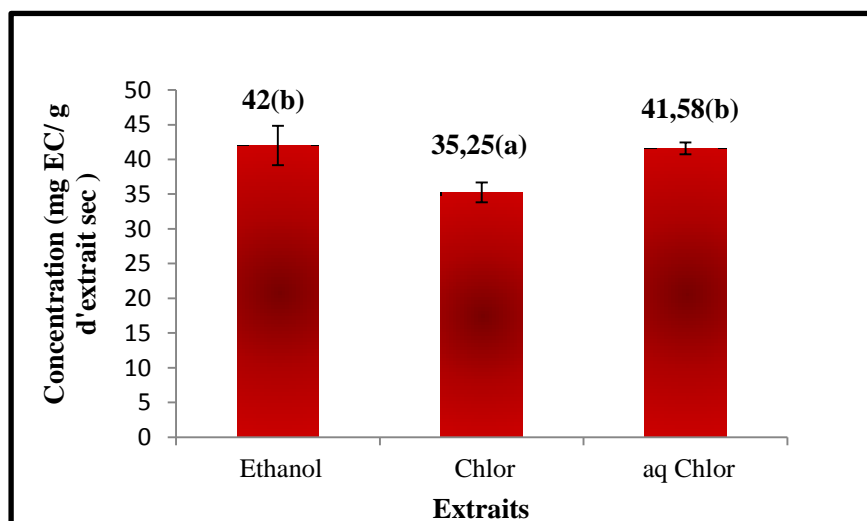


Figure 20 : Teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.*

chlor : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre que les teneurs en tanins condensés des différents extraits ont présenté des différences significatives ($\alpha < 0,05$) (figure 20).

Les teneurs les plus élevées ont été présentées par l'extrait éthanolique ($42 \pm 2,82$ mg d'extrait équivalent catéchine / g d'extrait) et l'extrait aqueux chloroforme ($41,58 \pm 0,87$

mg d'extrait équivalent catéchine /g d'extrait), et enfin l'extrait chloroforme ($35,25 \pm 1,41$ mg d'extrait équivalent catéchine / g d'extrait).

En outre, nous constatons que la teneur dans l'extrait aqueux chloroforme ($41,58 \pm 0,87$ mg EC/g d'extrait) est très significative à celle de l'extrait organique du chloroforme ($35,25 \pm 1,41$ mg EC/g d'extrait), cela pourrait être dû à la nature biochimique des tanins condensés qui sont des polymères riche en groupements hydroxyles qui sont solubles dans les solvants polaires (Schofield et al., 2001).

III-2- Activité antioxydante

III-2-1- Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'un électron ou donation d'atome d'hydrogène, qui se traduit par une coloration verte (Sweetie et al., 2007). La figure ci-dessous représente le pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.* et du standard BHA.

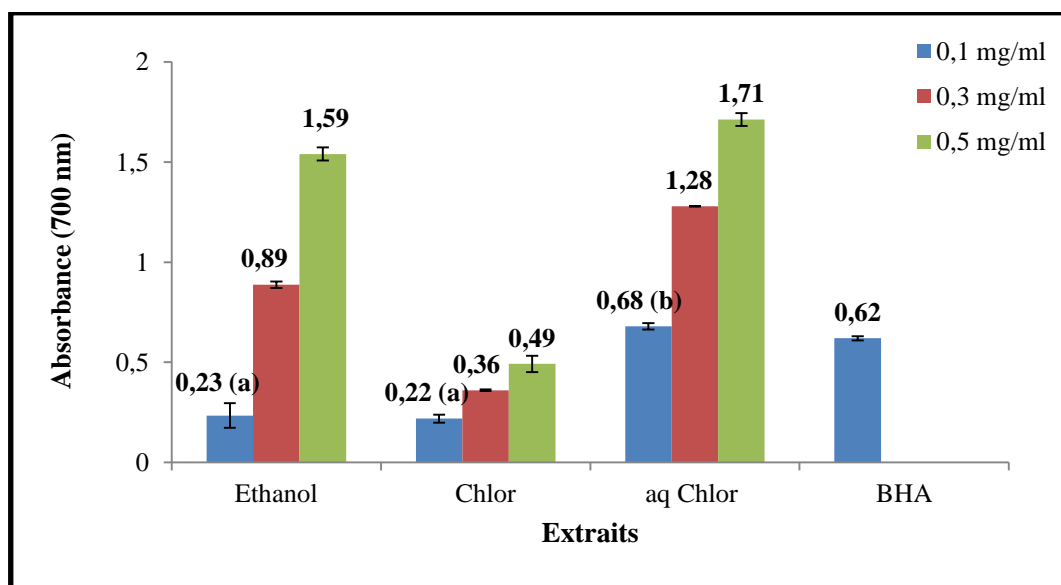


Figure 21: Représentation graphique du pouvoir réducteur des différents extraits des feuilles de *Mentha spicata L.* et de standard BHA. (chlor : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme).

L'étude statistique montre une différence significative entre le pouvoir réducteur des extraits ($\alpha < 0,05$).

Une vue d'ensemble de ces résultats, nous permet de constater que le pouvoir réducteur de *Mentha spicata L* est significative comparativement au standard utilisé (BHA) à 0,1 mg/ml. Une étude menée par **Soni et al., 2013** a montré aussi que le pouvoir réducteur de *Mentha spicata L* est très significative comparativement au standard utilisée.

Nous pouvons constater à partir de ces résultats que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration. Nous remarquons également que c'est l'extrait aqueux de chloroforme qui a exhibé le pouvoir réducteur très significative par rapport à l'extrait éthanolique, cela serait dû à la richesse de la plante en composés phytochimiques qui engendrent un encombrement stérique à 0,1 mg/ml (**Kapp, 2015 ; Abed Al-Ani, 2016**).

On constate également, que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné une absorbance supérieure à celle de l'extrait organique à 0,1 mg /ml, cela pourrait s'expliquer par la richesse des extraits aqueux en flavonoïdes et en tanins condensés qui sont des polymères riches en groupements hydroxyle donateurs d'hydrogènes et d'électrons. Cela est confirmé par l'existence de la corrélation significativement positive entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir réducteur ($r = 0,63$) (Annexe 13).

III-2-2-L'activité scavenging du radical DPPH[•]

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH[•], des standards et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure ci-dessous :

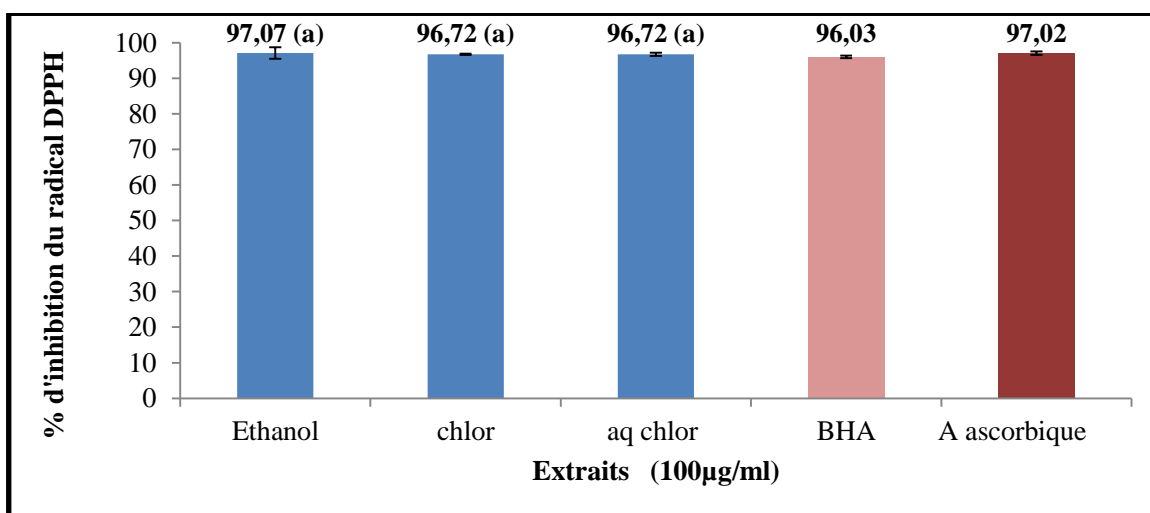


Figure 22: Activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits des feuilles de *Mentha spicata L* et des standards (BHA et l'acide ascorbique). chlor :chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre qu'il n'existe pas une différence significative entre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits ($\alpha < 0.05$). En effet, une vue d'ensemble de cette représentation graphique, nous laisse remarquer que tous les extraits testés à 100 $\mu\text{g/ml}$ de *Mentha spicata L* ont révélé forte activité scavenging du radical DPPH \cdot comparativement aux standards utilisés : l'acide ascorbique et la BHA qui ont donné des pourcentages d'inhibition de $97,02\% \pm 0,95\%$ et de $96,03\% \pm 1,34\%$, respectivement.

Par ailleurs, il existe une corrélation significativement positive entre les teneurs en tanins condensés et les pourcentages scavenging du radical DPPH ($r = 0,54$) (Annexe 10).

- **Détermination des IC_{50} :**

Le paramètre IC_{50} est défini comme étant la concentration du substrat qui entraîne une perte de 50% de l'activité (Khadhri et al., 2012). Les IC_{50} de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important.

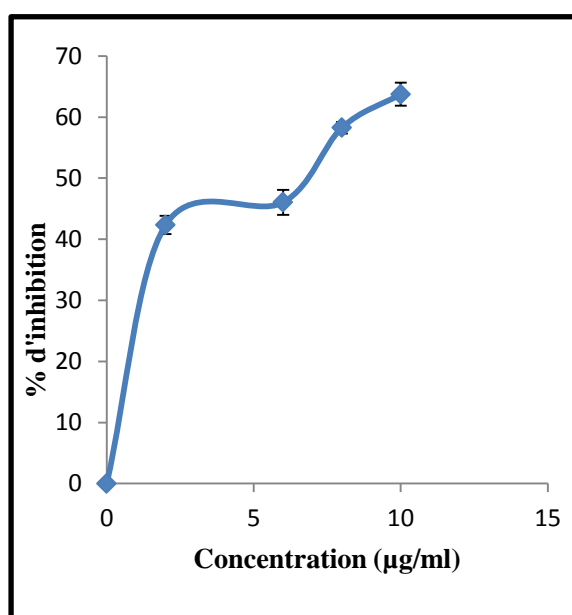


Figure 23: Activité scavenging du radical DPPH \cdot à différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de *Mentha spicata L*.

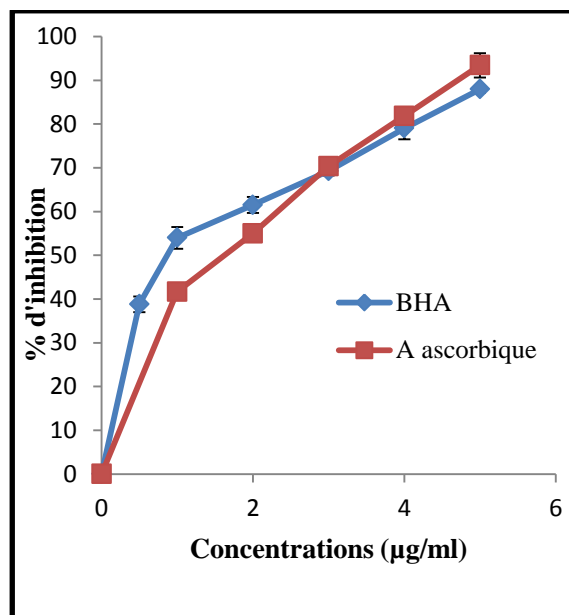


Figure 24 : Activité scavenging de radical DPPH \cdot à différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.

D'après les résultats obtenus dans la figure 23 qui présente l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH[•], de l'extrait éthanolique des feuilles, on déduit que l'activité anti-radicalaire proportionnelle à la concentration de l'extrait.

Dans le cas de notre échantillon, l'IC₅₀ = 3,35 µg/ml est supérieure à celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont, respectivement, des IC₅₀ égales à 0,98 µg/ml et IC₅₀ = 1,61 µg/ml (figure 24).

Notre résultat montre que l'IC₅₀ de notre extrait est inférieure à celle obtenue par Sweetie *et al.* (2007) qui est de IC₅₀ = 25,8 µg/ml.

III-2-3- Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

La figure (25) représente les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical ABTS^{•+}, des standards et des extraits exprimés en pourcentages.

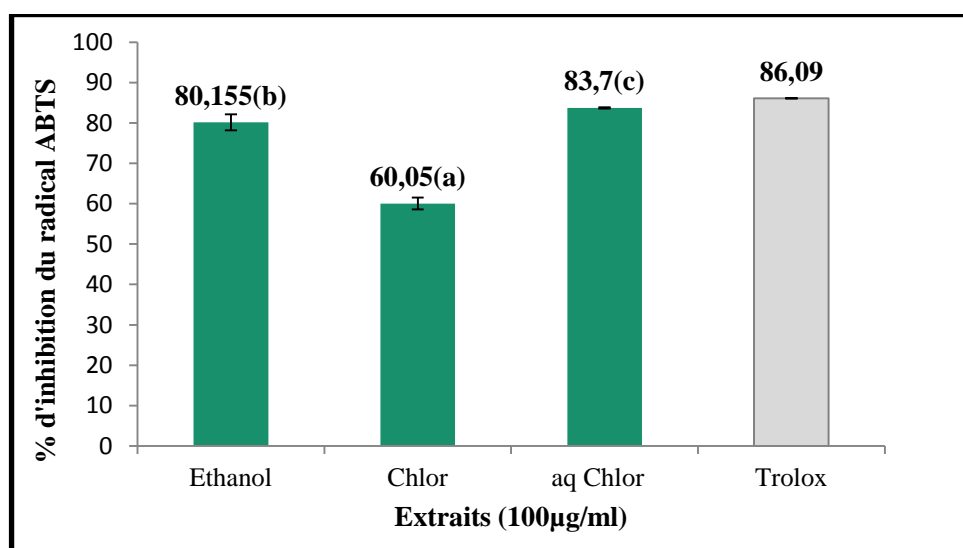


Figure 25: Activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} par les extraits de *Mentha spicata* L. et des standards (Trolox). chlor : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre une différence significative entre les pourcentages d'inhibition du radical ABTS des extraits ($\alpha < 0,05$). L'extrait aqueux chloroforme a présenté la meilleure activité 83,7% \pm 0,14% suivi d'extrait éthanolique et d'extrait organique du chloroforme avec des valeurs, respectivement, de 80,15% \pm 0,14%, 60,05% \pm 1,44% par rapport à standard utilisé (Trolox).

Aussi, nous remarquons que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné un pourcentage d'inhibition très significatif par rapport à l'extrait éthanolique, cela est dû au

fait que l'extrait brut est riche en composés phénoliques donc il y aurait un encombrement stérique qui empêche la réduction de l'ABTS^{•+}.

En outre, c'est l'extrait aqueux du chloroforme (83,7% ±0,14%) qui a donné plus que l'extrait organique (60,05% ±1,44%), vu sa richesse en flavonoïdes (Figure 17) qui ont une très forte activité antioxydante et en tanins condensés (Figure 18) qui sont des polymères riches en groupements hydroxyles donateurs d'hydrogènes et d'électrons.

Effectivement, ces résultats sont d'autant plus confirmés par l'existence d'une corrélation significativement positive entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et les flavonoïdes ($r=1$), ainsi que les tanins condensés ($r=0,98$) (Annexe 11).

- **Détermination des IC₅₀ :**

Les figures représentées ci-dessous montrent l'évolution du pourcentage d'inhibition d'ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *Mentha spicata L.* et celles du standard Trolox respectivement.

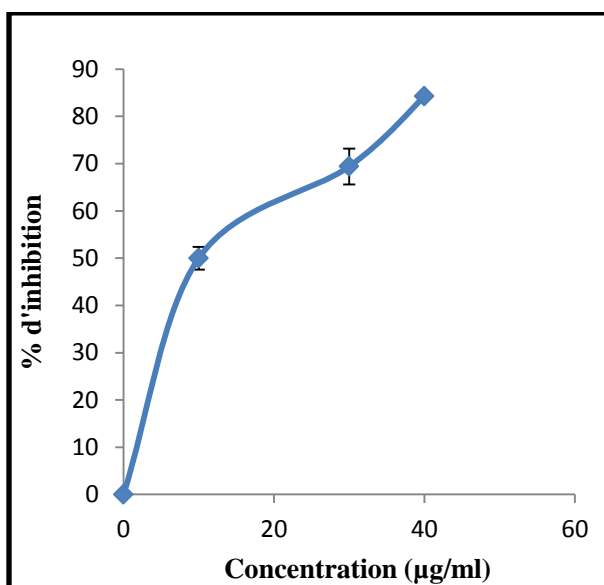


Figure 26 : Activité scavenging du radical ABTS^{•+} à différentes concentrations de l'extrait aqueux du Chloroforme de *Mentha Spicata L.*

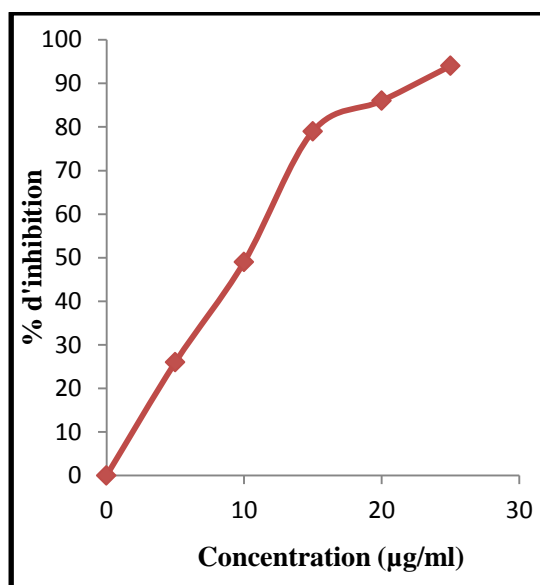


Figure 27: Activité scavenging du radical ABTS^{•+} à différentes concentrations de standard Trolox.

D'après les figures (26 et 27) ci-dessus, nous pouvons constater en premier lieu que l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} est proportionnelle à la concentration. On note que la concentration de l'extrait aqueux du chloroforme a donné une valeur de IC₅₀=

10 µg/ml voisine à celle du standard Trolox ($IC_{50} = 9,72 \mu\text{g/ml}$). Ceci indique que notre plante possède une forte activité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$. Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par **Brahmi et al., 2015** ($IC_{50} = 10,3 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$).

II-4- Activité chélatrice du fer

Le protocole de chélation du fer est un test qui met en évidence la capacité d'une molécule des extraits à chélater le fer. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci-dessous :

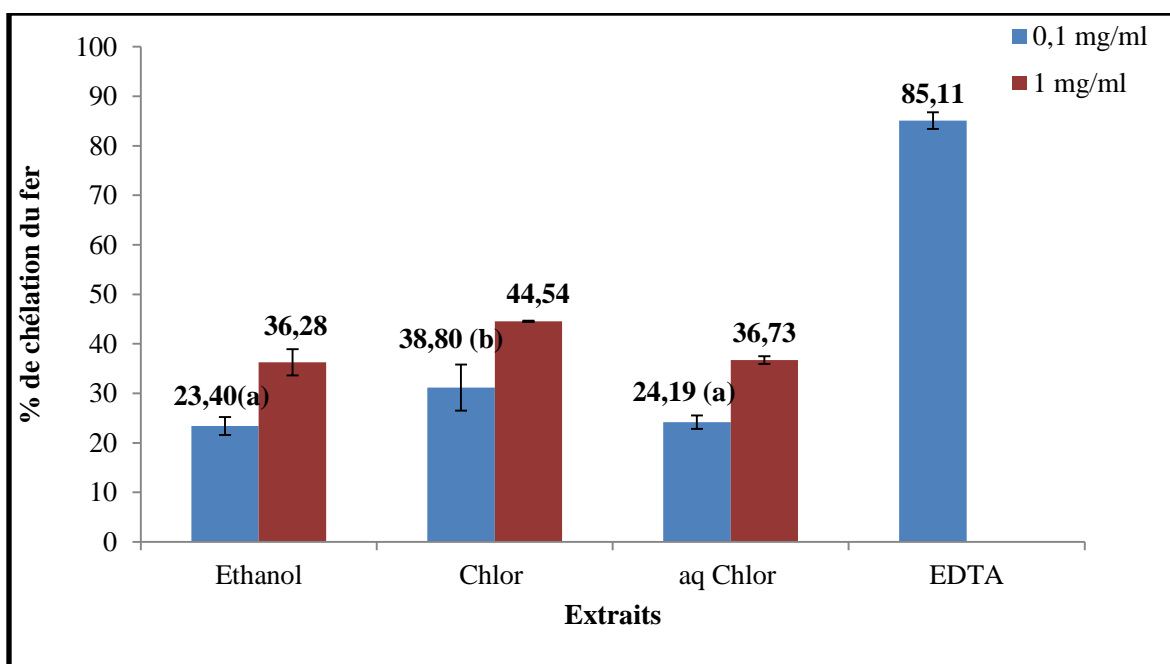


Figure 28 : Représentation graphique du chélation de fer des extraits des feuilles de *Mentha spicata L.* et de standard EDTA. chlor : chloroforme, aq chlor : aqueux chloroforme.

L'étude statistique montre une différence significative entre l'activité chélatrice des extraits ($\alpha < 0,05$). Une vue d'ensemble de cette figure nous laisse remarquer que l'activité chélatrice de la plante est faible, cela revient à la nature biochimique des composés phénoliques des extraits, bien qu'ils contiennent des quantités appréciables en phénols totaux. En effet, **Arumugam et al., (2009)** ont montré que l'activité chélatrice du fer de *Mentha spicata L.* est faible par rapport au standard (EDTA).

La structure de ces composés ne donne pas une bonne chélation de fer contrairement au standard (EDTA) qui a donné un pourcentage de chélation de $85,11 \pm 1,68 \%$.

Nous constatons également, que c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné une plus forte activité chélatrice étant donné sa richesse en huiles essentielles qui auraient une forte activité chélatrice du fer (**Laggoune *et al.*, 2016**).

En effet, il existe une corrélation significativement positive entre la teneur en phénols totaux, et proanthocyanidines et la chélation du fer, respectivement ($r=0,85$), ($r=0,99$) (Annexe 12).

CONCLUSION

Les plantes médicinales ont été employées en tant que traitements traditionnels pour de nombreuses maladies humaines depuis des milliers d'années. *Mentha spicata L* est une plante qui a été largement étudiée pour ses propriétés médicinales grâce à sa richesse en composés phénoliques et en huiles essentielles.

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et du pouvoir antioxydant des différents extraits de *Mentha spicata L*.

Notre étude a abouti aux résultats suivants :

- L'évaluation de la teneur en phénols totaux indique que la plante est très riche en phénols totaux de teneurs comprises entre $66,87 \pm 9,62$ à $248,97 \pm 2,69$ mg EAG/g d'extrait.
- Concernant le contenu en flavonoïdes, les feuilles de *Mentha spicata L* ont montré des teneurs élevées et ce sont les extraits aqueux qui ont donné les valeurs maximales de 36,17 mg EQ/g d'extrait.
- Les extraits de *Mentha spicata L* ont dévoilé des taux modérés en tanins condensés de $35,25 \pm 1,41$ à $42 \pm 2,82$ mg EC/g d'extrait.
- En ce qui concerne l'activité scavenging du radical DPPH•, du radical ABTS•⁺ et le pouvoir réducteur des extraits, qui ont montré de fortes activités par rapport aux standards utilisés, avec des IC₅₀ de 3,35 mg/ml et 10 mg/ml, respectivement.
- Néanmoins, l'activité chélatrice de ces extraits a été faible comparativement au standard.
- Enfin, l'activité antioxydante peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, où les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydantes testées et les teneurs en composés phénoliques.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les teneurs en composés phénoliques, la nature biochimique et l'activité antioxydante de *Mentha spicata L*.

Par ailleurs, Il serait intéressant d'approfondir les recherches sur ses propriétés pharmacologiques, et d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests antioxydants *in vivo* afin d'étudier l'efficacité et la toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés ; aussi bien que de s'investir dans d'autres parties de la plante, à savoir, la tige et les fleurs.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdou Bouba, A., Njintang, Y.N., Scher, J. and Mbofung, C.M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3): 213-224.
- Abed AL Ani, K. A. M. (2016). Primary Phytochemical Identification and some Biochemical Parameters Study of Ethanolic Extract of *Mentha spicata* Leaves in Mice. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(7): 818-822.
- Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F. and Abdinian, M. (2016). Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Science*, 61: 175-179.
- Alaei, S., Rezaei, S. and Ziaei, G. (2005). Evaluation of the Effects of *Mentha Spicata* Extract on *In-Vitro* Maturation of Mouse Oocytes. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies*, 2(2) : 200-203.
- Almeida, P.P., Mezzomo, N. and Ferreira, R.S. (2012). Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. *Food Bioprocess Technol*, 5: 548–559.
- Amar, C. (2010). Stress oxydatif, Chalcium et Thermalism. *Press Therm Climat*, 147(2):121-138.
- Arumugam, P., Murugan, R., Subathra, M. and Ramesh, A. (2009). Superoxide radical scavenging and antibacterial activities of different fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* (L.). *Medicinal Chemistry Research*.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. and Khebri, S. (2010). Activite Anti-oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1): 69-81.

B

- Ba, K., Tine, E., Destin, J., Cissé, N. and Thonart P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14 (1): 131-139.

- Bagheri, S., Ebrahimi, M. A., Davazdahemami, S. and Moghadam, J. M. (2014). Terpenoids and Phenolic Compounds Production of Mint Genotypes in Response to Mycorrhizal Bio-Elicitors. *Technical Journal of Engineering and Applied L.* 339-348.
- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A. and Laglaoui, A. (2015). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Lavoisier SAS.* 1-9.
- Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Saleena Taip, F., Ganjloo, A., Md Salleh, L., Selamat, J., Hamid, A. and Zaidul, I.S.M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 67–72.
- Boizot, N. and Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *INRA-Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyse Biochimique.*
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudeau, J., Thérond, P., Legrand, A. and Delattre, J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 : 260-267.
- Bougandoura, N. and Bendimerad, N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie*, 9 : 14-19.
- Brahmi, F. (2016). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelque espèces du genre mentha : cas de M.spicata L., M.puleguim L. et M.rotundifolia L. huds.* Thèse doctorat, Université Abderrahmane Mira Bejaia, p31-32.
- Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Procedda, S., Piras, A., Falconieri, D., Yalaouni-Guellal, D., Elsebai, M. F., Madani, K. and Chiban, M. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium L.* and *Mentha rotundifolia (L.) Huds* growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*.10.

- Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, K., Kiendrebeogo, M., Kamagaju, L., Stévigny, C., Chibane, M. and Duez, P. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (*Lamiaceae*). *Industrial Crops and Products*, 74 :722-730.
- Brahmi, F., Madani, K., Dahmoune, F., Rahmani, T., Bousbaa, K., Oukmanou, S., Chibane, M. (2012). Optimisation of Solvent Extraction of Antioxidants (Phenolic Compounds) From Algerian Mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications*, 2: 72-86.
- Bremss, L. *Plantes aromatiques et médicinales 700 espèce*. A Dorling Kindersley Book. Paris: Larousse, 2011. 190 p.

C

- Carrière, A. Galinier, A. Fernandez, Y. Carmona, M.C. Pénicaud, L. and Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine / Sciences*, 221: 47-53.
- Chaing, H.C., Lo, Y.J. and Lu, F. J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Also philaspinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme inhibition*, 8 (1): 61-71.

D

- Desbordes, F. (2008). La Nutrition, la santé, le Bien-être : SOD superoxyde Dismutase. *FOCUS infos*.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 161-169.
- Dorman, H. J. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *mentha spicata*, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4563-4569.

E

- Enneb, H., Belkadhi, A., CHEOUR, F. and Ferchichi, A. (2015). Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis L.*). *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*, 20(2) : 788-793.

F

- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* .108-115.

G

- Gardés-Albert, M., Bonnefont, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chimique*. 91-96.
- Griveau, J. F., et Le Lanou, D. (1995). Radicaux libres et spermatozoïdes humains, physiologie et physiopathologie. *Andrologie*, 5 (3) : 369-381.

H

- Hajighasemi, F., Hashemi, V. and Khoshzaban., F. (2011). Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20) : 5142-5147.
- Haleng, J., Pinecemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C. and Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10): 628-638.
- Hemalatha, S., Lalitha, P. and Arulpriya, P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6): 84-89.

I

- Igor-Passi, L. B. (2003). *Etudes des activités biologiques Fagara Zanthoxy Loi des lam (Rutaceae)*. Thèse de doctorat, Université de Bamako, p 6-60.

- Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compound in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126: 1821-1835.

J

- Jayanthi, P. and Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia Crassipes* (Mart) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 3 (3): 126 – 128.

K

- Kanatt, S. R., Chander, R. and Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata L.*) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100 : 451–458.
- Kapp, K. (2015). Polyphenolic and Essential oil composition of *Mentha* and their Antimicrobial effect. *Division of pharmaceutical bioseiences faculty of pharmacy university of Helsinki Finland*. 11-58.
- Kathiresan K. (2003). Insect folioivory in mangroves. *Indian Journal of Marine Sciences*, 32 (3): 237-239.
- Khadhri, A.L., Mokni, E. R. and Smiti, S.I. (2012). Composés phénoliques et activités antioxydants de deux extraits de chardon à glu. *Science of Nature*, 39 : 44-52.
- Khoddami, A., Meredith A., Wilkes. and thomas, H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molécule*, 18: 2328-2375.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 :165-177.

L

- Laggoune, S., Öztürk, M., Erol, E., Duru, M. E., Abaza, I., Kabouche, A. and Kabouche, Z. (2016). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Mentha spicata L.* from Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7 (11): 4205-4213.
- Laguerre, M., Le Compt, J. and Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxydants to conteraclipid oxydation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282.

- Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L. J., Pina, M. and Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Fondamental*, 14 (5) : 278-292.
- Landsdown, R.V. (2014). *Mentha spicata*. The IUCN Red List of Threatened species. "www.iucnredlist.org".
- Le, K., Chiu, F. and Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353 – 363.

M

- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. and Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/Science*, 20(4) : 458-463.
- Margail, I. Plotkine, M. and Lerouet. D. (2005). Antioxydant strategies in the treatment of stroke. *Free radical biologie and medicine*, 39: 429-443.
- Mojzer, E.B., Hrnčič, M. K., Škerget, M., Knez, Ž. and Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(901): 2-38.
- Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E. and Huysmans, S. (2009). Micromorphology and character Evolution of Nutlets in Tribe Mentheae (Nepetoideae, Lamiaceae). *Systematic Botany*, 34(4): 760-776.

N

- Nanekarani, S., Goodarzi, M. and Heidari, M. (2012). The Effect of Different Levels of Spearmint (*Mentha Spicata*) Extract on Immune System and Blood Parameters of Broiler Chickens. *APCBEE Procedia*, 4: 135 – 139.

O

- Ogunlana, O.E., and Ogunlana, O. O. (2008). *In vitro* assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (8): 176 – 179.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 (6): 307-315.
- Oyedemi, S. O. and Afolayan, A. J. (2011). *In vitro* Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis* (L.) R. Br. *International Journal of Pharmacology*, 7 (2): 248 – 256.

P

- Paul, K and Irfan, R. (2006). Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as therapeutic strategy. *Pharmacology and Therapeutics*, 111: 476-494.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.

R

- Ravisé, A. and Chopin, J. (1979). Influence de la structure de composé phénolique sur l'inhibition du phytophthora parasitica et d'enzyme participant aux processus parasitaires. *Phytopath Zeitschrift Journal of Phytopathology*, 100 : 257-269.
- Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian le Goff, L. and Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate? Implication sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod, paris*.
- Richard, T., Temsamani, H., Delaunay, J.C., Krisa, S. and Mérillon, J.M. (2014). Stilbénes : de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 49 :173-180.

S

- Sarni-Manchado, P. and Cheynier, V. (2006). Composés phénolique de la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : *les polyphénols en agroalimentaire. Technique et médical* : p 2-11.
- Scalbert, A. and Fardet, A. (2006). stress oxydant et antioxydants à la recherche d'un nouveau paradigme. *NAFAS*, 4(1): 3-10.
- Senoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and Vincenzo Defeo. (2015). *Mentha spicata* essentiel oil : chemical composition, antioxydant and antibacterial activités. A gainst planktonic and biofilm cultures of vibrio sppstrains. *Molécules*, 20: 14402-14424.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. and Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21-40.

- Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and Feo, V. (2015). *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20: 14402-14424.
- Soni, A. and Sosa, S. (2013). Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2 (4): 22-29.
- Soysal, Y. (2005). Mathematical Modeling and Evaluation of Microwave drying Kinetics of mint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Applied Sciences*, 5(7): 1266-1274.
- Sweetie, R. K. Ramesh, R. and Arum S. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100 :451-458.

T

- Talbi, H., Boumaza, K.M., Talbi, J. and Hilalai, A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Mate-Environ. Sciences*, 6 (4): 1111-1117.
- Teixeira, M. L., Cardoso, M. D. G., Figueiredo, A. C. S., Moraes, J. C., Assis, F. A., Andrade, J., Nelson, D. L., Souza Gomes, M., Souza, J. A. and Albuquerque, L. R. M. (2014). Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1181-1190.

V

- VALKO, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell biology*, 39: 44-84.
- Vergely, C. and Rochette, L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie*, 1(3): 131-139.

Y

- Yap, C.F., Ho, C.W., Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y. and Leong, Y.S. (2009). Optimisation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola* L.) Residus. *Sains Malaysiana*, 38 (4): 511-520.

- Yu, L. Methods for antioxidant capacity estimation. In: *Wheat Antioxidants*. WILEY. France, 2008.P. 288.

Z

- Zekri, N., Elazzouzi, H., Drioche, A., Satrallah, A., Belghiti, M. A. and Zair, T. (2016). Effect of Geographic Locations on Chemical Composition of *M. Spicata L.* Essential oils from Moroccan Middle-Atlas. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (4):146-150.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe N°1 : Préparation de la solution de Folin-Ciocalteu (10%, v/v) et la solution de carbonate de sodium

- La solution est préparée comme suit :
- 10 ml de Folin-Ciocalteu + 90 ml d'eau distillée.
- 7,5 g de carbonate de sodium + 100 ml d'eau distillée.

Annexe N°2 : Préparation de la solution au chlorure d'aluminium

- 133 mg AlCl_3 + 400 mg d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.

Annexe N°3 : Préparation de la solution de la vanilline (4%, w/v)

- 4 g de la vanilline + 100 ml de méthanol.

Annexe N°4 : Préparation de la solution de DPPH (0,1mM)

- 11,83 mg de DPPH + 300 ml du méthanol.

Annexe N°5 : Préparation de la solution mère d'ABTS^{•+} (7 mM)

- 72 mg de l'ABTS + 13,24 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) dans 20 ml d'eau distillée + 13,24 mg de persulfate de potassium (2,45 mM), agiter et laisser incubé pendant 16 h à l'obscurité. Cette solution est diluée jusqu'à atteindre une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Annexe N°6 :

1-Préparation de la solution de FeCl_2 (0,2 mM)

- 3,255 mg de FeCl_2 + 100 ml d'eau distillée.

2-Préparation de la solution de Ferrozine (5 mM)

- 51,046 mg Ferrozine + 20 ml.

Annexe N°7 :

1-Préparation de la solution tampon (0,2 M, PH= 6,6)

- NaH_2PO_4 (acide) : 3,12 de NaH_2PO_4 + 100 ml d'eau distillée.
- Na_2HPO_4 (base) : 3,56 g de Na_2HPO_4 + 100 ml d'eau distillée.

2-Préparation de la solution de Ferricyanure de potassium (1%)

- 1 g de Ferricyanure de potassium + 100 ml d'eau distillée.

3-Préparation de la solution d'acide trichloracétique (10%)

- 10 g de TCA + 100 ml d'eau distillée.

4-Préparation de la solution de FeCl_3 (0,1 %)

- 0,1 g de FeCl_3 + 100 ml d'eau distillée.

Annexes N°8 : Courbes d'étalonnage utilisés pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

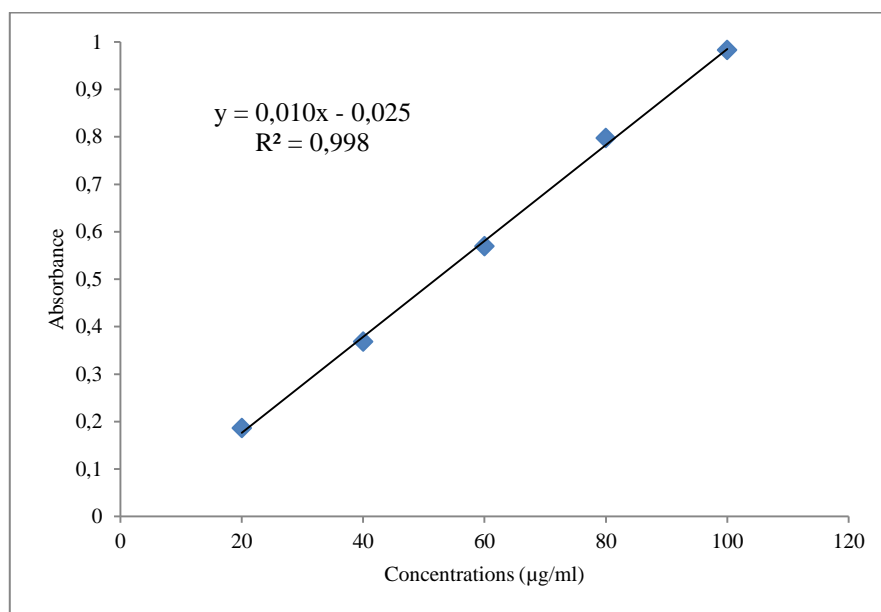


Figure 1: Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda=765$ nm).

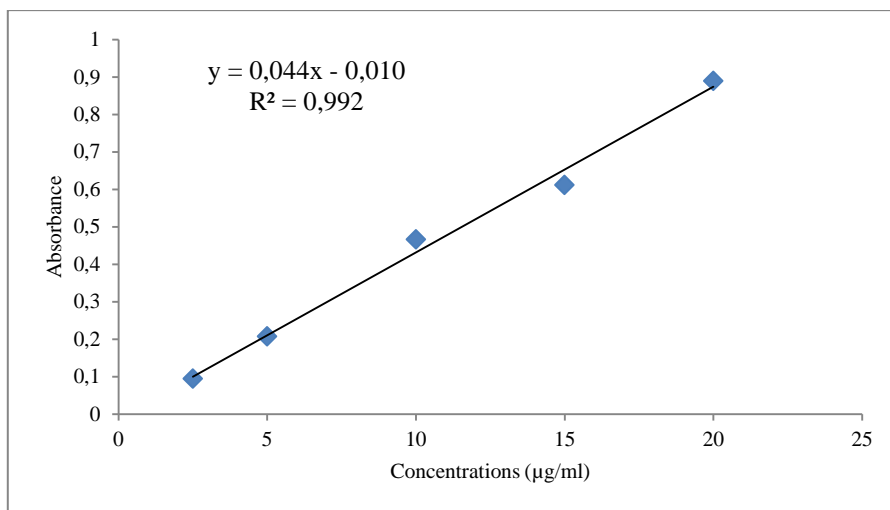


Figure 2 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda=430\text{nm}$).

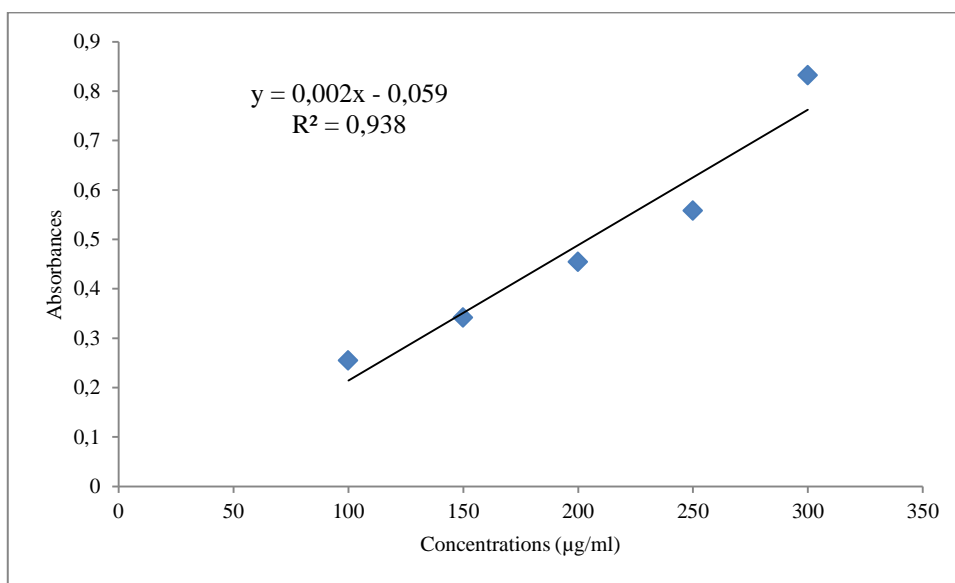


Figure 3 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour les le dosage des proanthocyanidines ($\lambda=500\text{nm}$).

Annexes N°9: Courbes de calcul de l'IC₅₀ dans l'activité scavenging du radical DPPH.

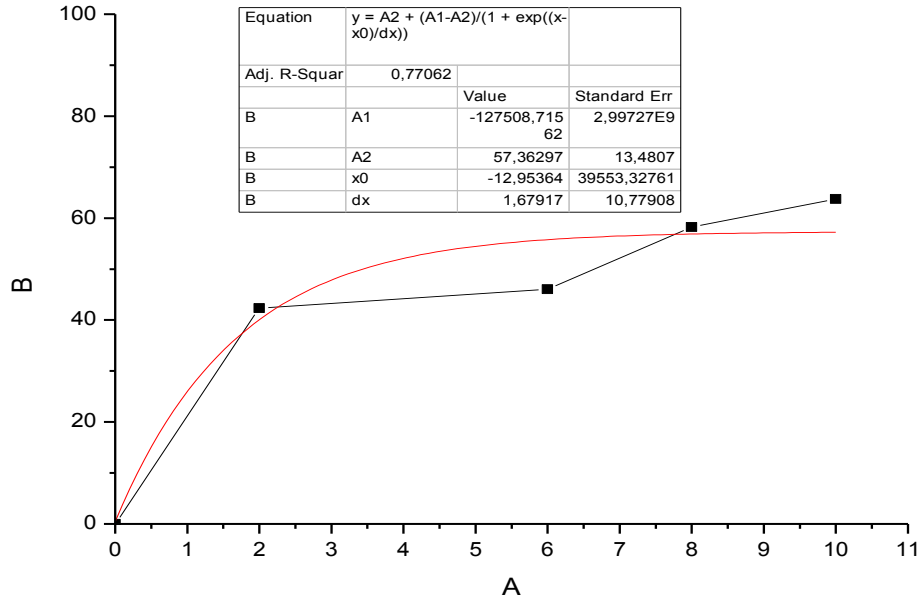


Figure 4 : Courbe pour calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique

Annexes N°10 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

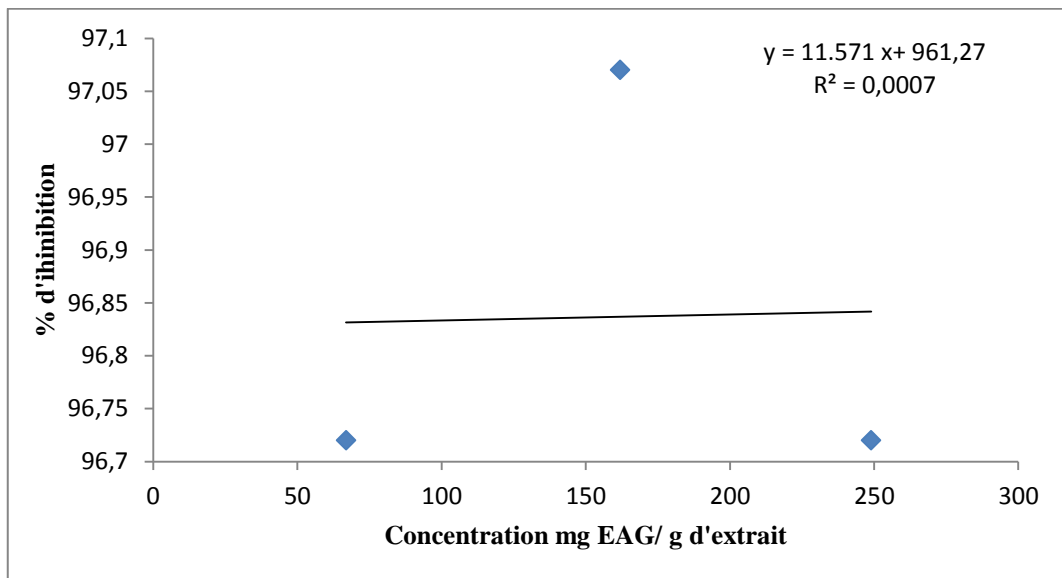


Figure 5: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux.

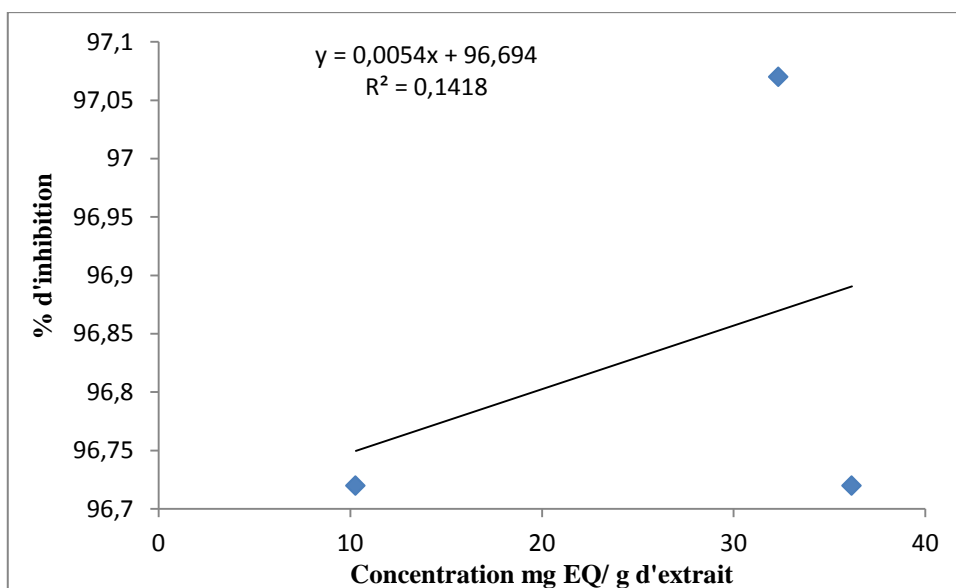


Figure 6: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en flavonoïdes.

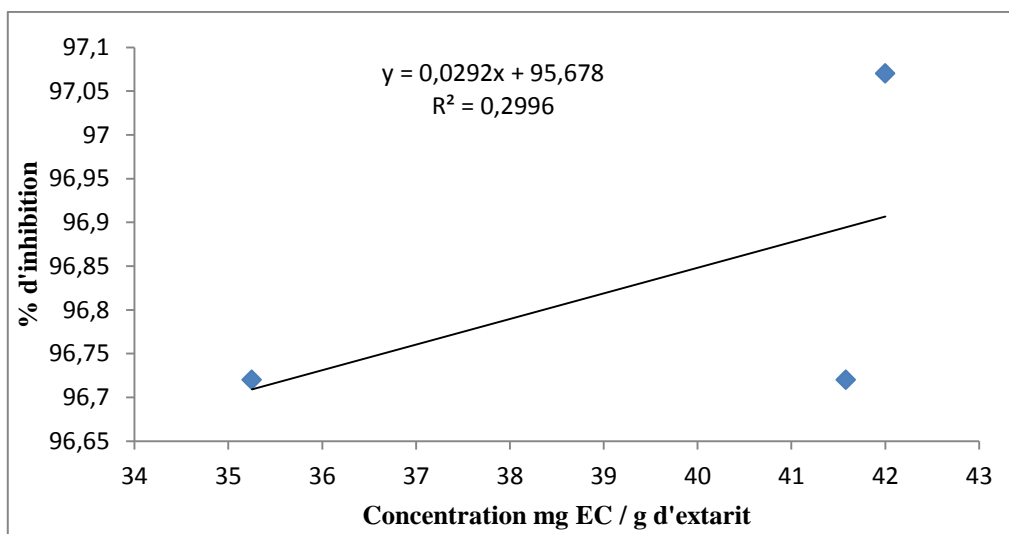


Figure 7: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en tanins condensés.

Annexes N°11 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en phénols totaux, en flavonoides et en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

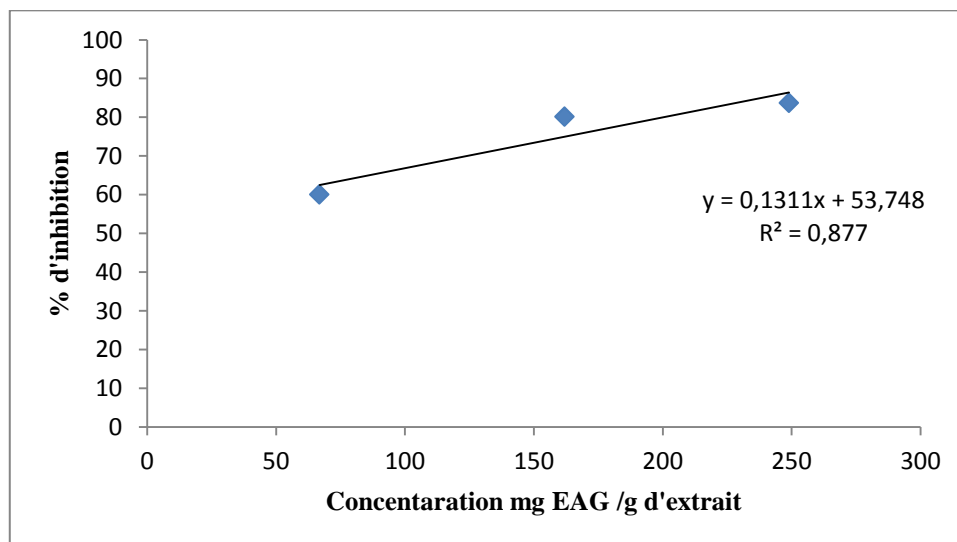


Figure 8: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en phénols totaux.

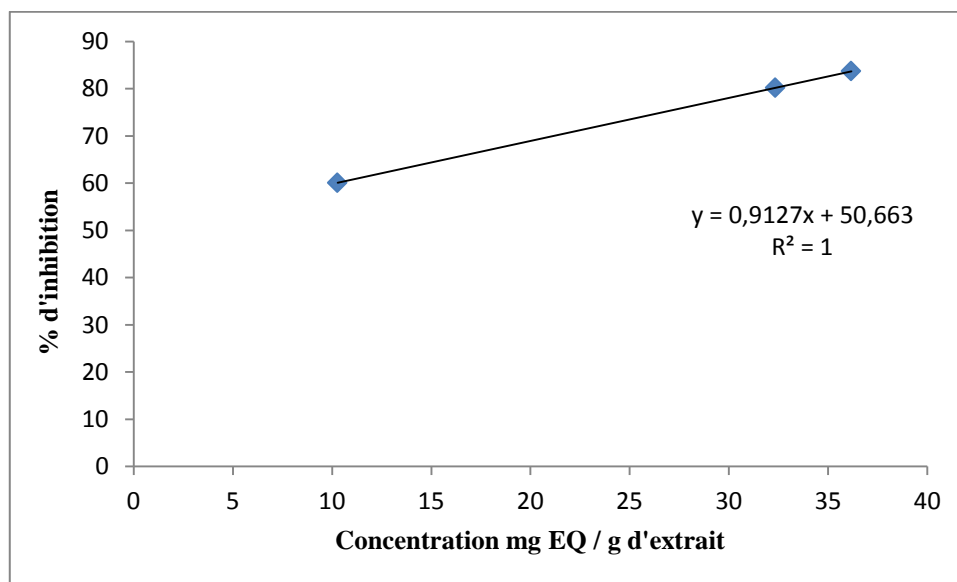


Figure 9: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en flavonoides.

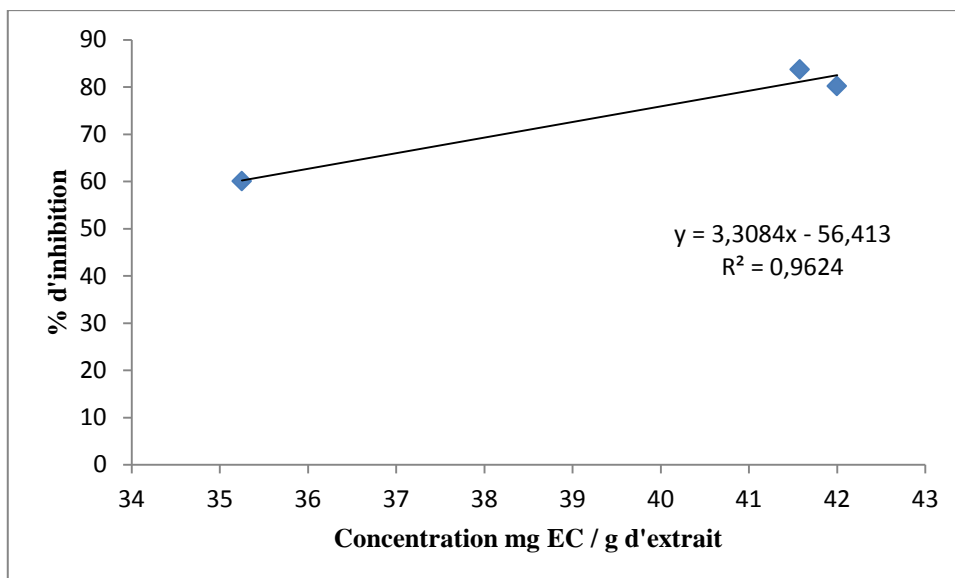


Figure 10: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical $ABTS^{++}$ et la teneur en proanthocyanidines.

Annexes N°12 : Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en phénols totaux, en flavonoides et en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

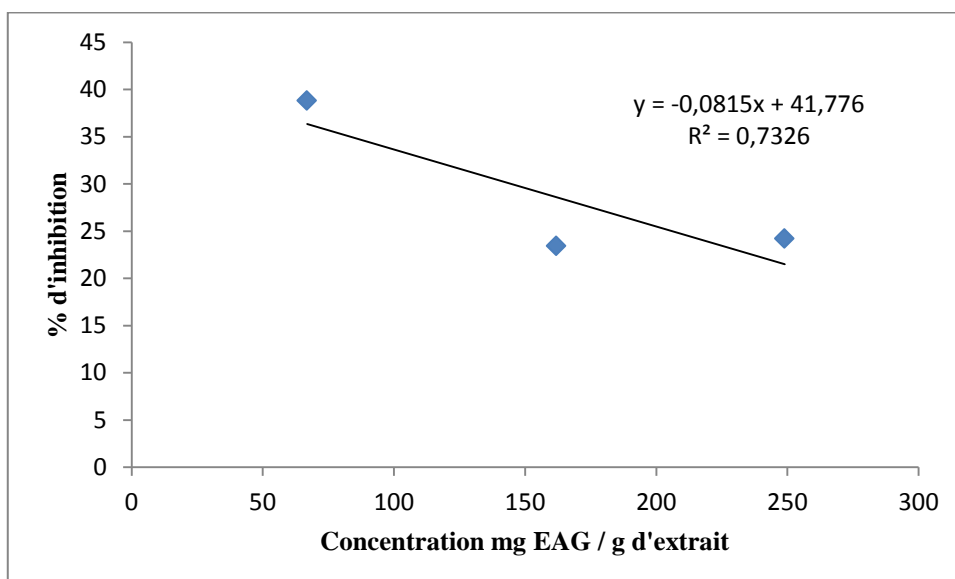


Figure 11: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en phénols totaux.

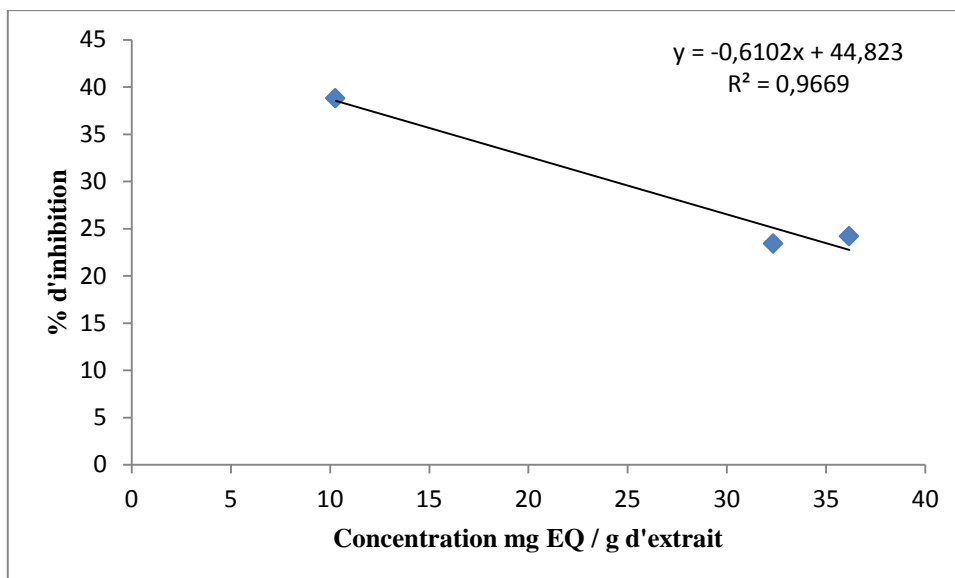


Figure 12: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en flavonoïdes.

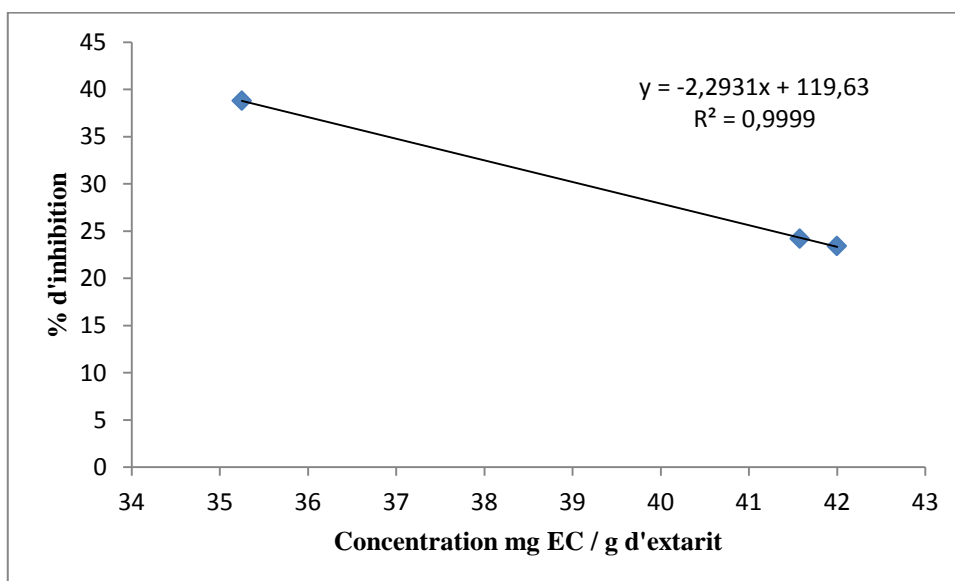


Figure 13: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en tanins condensés.

Annexes N°13: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

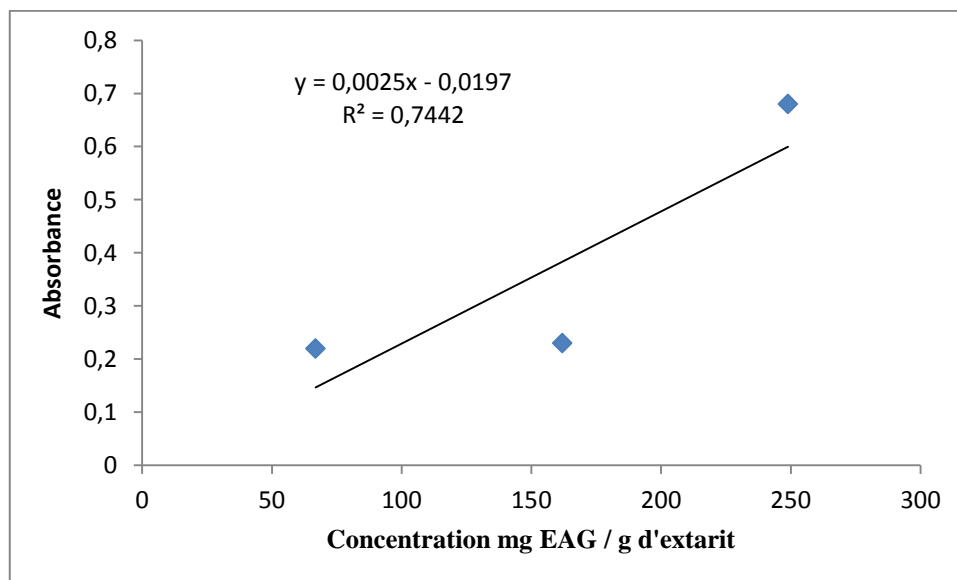


Figure 14: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux.

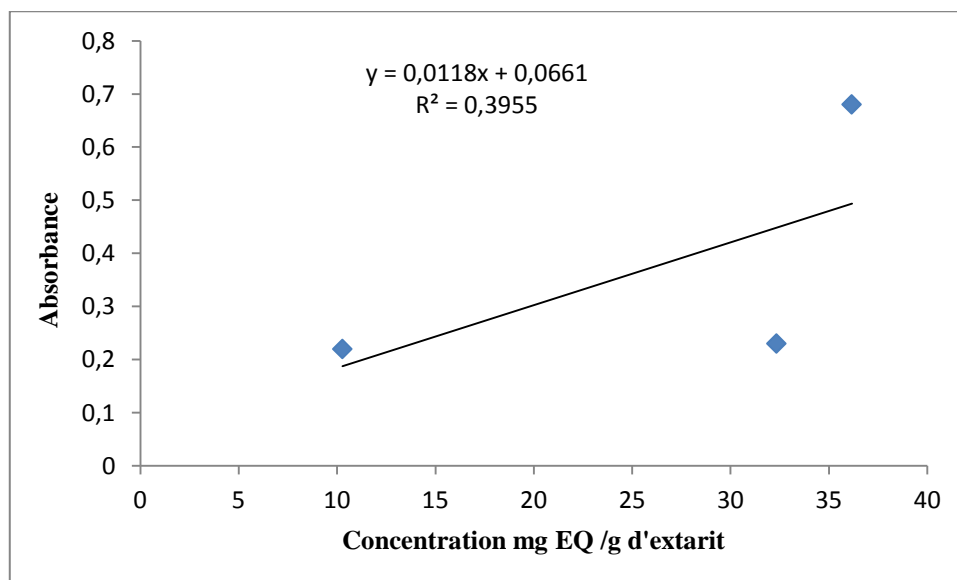


Figure 15: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes.

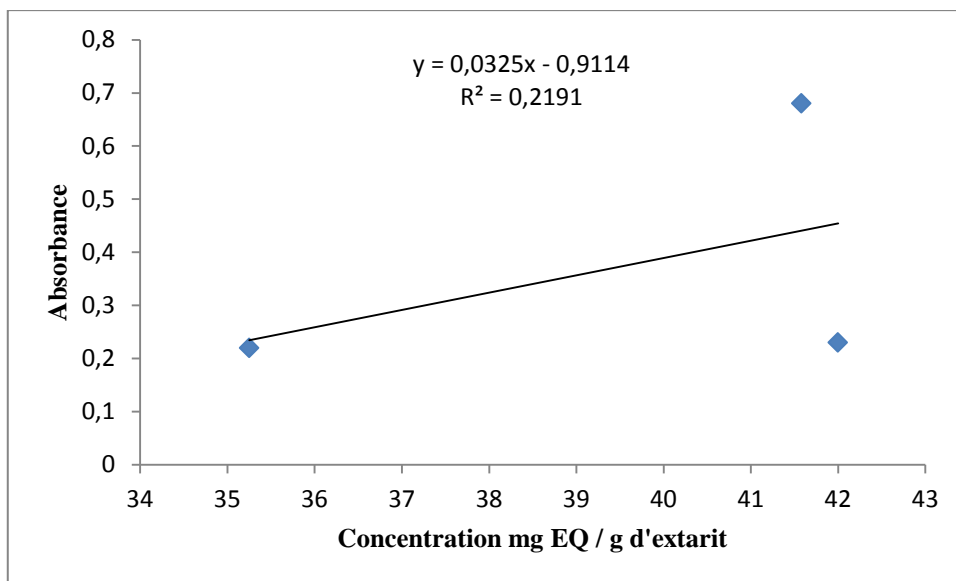


Figure 16: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en tanins condensés.

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Mentha spicata L*, et cela en faisant deux types de manipulations, après bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles.

Le dosage des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) est réalisé pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, la mesure de l'activité anti-oxydante des extraits en réalisant quatre tests : le pouvoir réducteur, l'activité scavenging des deux radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+} et la chélation du fer.

Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits de *Mentha spicata L* sont riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes et aussi ils ont exhibé des teneurs modérées en tanins condensés. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH[•], ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur sont forts. En revanche, l'activité chélatrice du fer a été faible.

Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mots clés : *Mentha spicata L*, radicaux libres, antioxydants, composés phénoliques, DPPH[•].

Abstract

Antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the antioxidant activity of extracted phenolic compounds from a local medicinal plant, *Mentha spicata L*. After extraction procedure, different plant leaves extracts were, First, quantified for their phenolic compounds amounts (total phenolic, flavonoids and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then we realized the anti-oxidant activities assays such as: DPPH[•] and ABTS^{•+} radical scavenging, the reducing power and iron chelation.

The experimental results revealed that *Mentha spicata L* extracts showed high amounts of total phenolics (66.87 ± 9.62 à 248.97 ± 2.69 mg EAG/g of extract), flavonoids (10.28 ± 0.48 à 36.17 ± 0.64 mg EQ/g of extract), and they exhibited moderate levels of condensed tannins. Furthermore, the antioxidant activities of this plant, extracts were found to be good scavengers of radicals DPPH (IC₅₀ of the leaves éthanolic extract was $3.35 \mu\text{g/ml}$), ABTS^{•+} ($60.05\% \pm 1.44\%$ à $83.7\% \pm 0.14\%$ et 0.22 ± 0.02 à 0.68 ± 0.01). However, the chelating activity of iron was low.

These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.

Keywords: *Mentha spicata L*, free radicals, antioxidants, phenolic compounds, DPPH[•].