

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Spécialité : Pharmaco-toxicologie .



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des
extraits de *Mentha spicata*.**

Présenté par :

MAKHLOUFI Karima & MAKHLOUF Salima

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr : Ouchmoukh. S

MCA

Président

Mme : Adrar .S

MAA

Encadreur

Mr : Tachrfouit.

MAA

Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

D'abord nous tenons à remercier, le bon Dieu de nous avoir procuré la patience et la force d'accomplir ce modeste travail.

Nous voulons exprimer nos profonds respects et remerciements à **M^{me} ADRAR S** pour l'honneur qu'elle nous a accordée en nous encadrant, pour ces orientations et conseils et pour nous avoir guidés de son mieux pour l'accomplissement de ce travail.

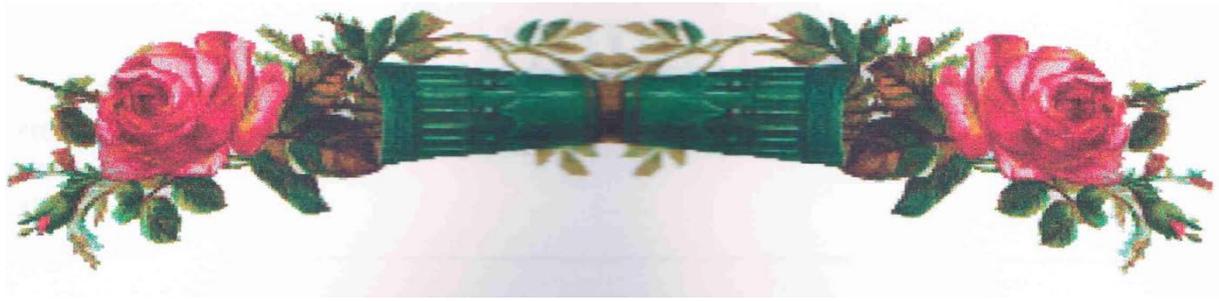
Nos remerciements s'adressent également à **M^r OUCHMOUKH S**, d'avoir accepté de présider le jury et **M^r TACHRFIOUT** pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Merci à **M^{me} Bejou F** pour nous avoir accueillie au sein de son laboratoire ainsi qu'à la technicienne de laboratoire Samia.

A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous Ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.

Merci





Dédicaces

Au nom de Dieu le tout puissant, celui qui m'a donné la vie et qui m'a permis d'apprendre

Et d'acquérir ce savoir, je dédie ce modeste travail à :

Mon étoile filante, qui exauce mes rêves, la personne de qui j'ai tiré la force, j'ai pris la persévérance ; celle qui m'a planté l'art de la réussite, rien que pour toi papa que j'aime tant.

La source qui déborde, si tendre, si adorable, qui m'a donné la vie, celle qui m'a éclaircie les chemins, rien que pour toi maman que tous les mots ne suffiront de te remercier.

Mes très chers frères : Samir et Oualid pour qui je souhaite une immense réussite.

Mes sœurs : Sabah, Wafiba, Lilia, Souhila, Farida et Lina.

A mes deux beaux frères : Azzedine et Abd'El Wahab ainsi que mes beaux petits neveux :

Salim, Samy et Wassim.

A mes tantes, oncles, cousins et cousines et leurs familles.

Atout mes amis : Nawal, Lydia, Zafia, Nadjat, Wenza, Samia, Asma, Lydia, Sihem...

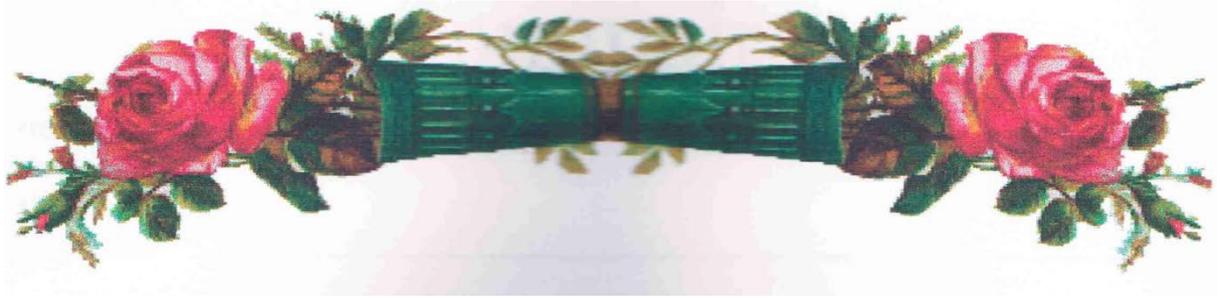
A toute la promotion 2017/2018 de Pharmacotoxicologie ainsi qu'aux professeurs qui nous ont

Accompagnés tout au long de ce beau parcours.

A mon amie et binôme Karima Makhloufi ainsi qu'à toute sa famille.

Salima.





Dédicaces

Au nom de Dieu le tout puissant, celui qui m'a donné la vie et qui m'a permis d'apprendre

Et d'acquérir ce savoir, je dédie ce modeste travail à :

A la mémoire de mon chère père, que dieu le bénisse dans son vaste paradis

A ma chère mère, Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.

A mes chers frères, Aziz, Hamid, Kader, Kamel, Yousef et Tahar

A mes chères sœurs, Horia, Khadidja, Hadjira et Noura

A mon cher mari Mustapha et sa famille

A mes oncles, tantes, cousins, cousines, a toutes la famille Makhloufi et OuldAmara

A mes amis qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliable, surtout mes meilleurs Aldja, Nouna, Nawel, Karima, Karima, Siham et Fata

Mes spéciales dédicaces pour ma très chère amie et binôme Salima et sa famille

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

A toute la promotion 2017/2018 de Pharmacotoxicologie ainsi qu'aux professeurs qui nous ont

Karima.



Liste des abréviations

ABTS: 2, 2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulph te.a

ADN: Acide desoxyribo-nucléique.

AlCl₃: chlorure d'aluminium.

AOX: Antioxydant.

BHA: Buty- hydroxyl- anisol.

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

EAG : Equivalent acide gallique.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique.

ERN : Espèce réactive d'azote.

ERO : Espèces réactives d'oxygène.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

FeCl₂ : chlorure de fer.

GPx : Glutathion peroxyde.

GSH : Glutathion avec la forme réduit.

GSSH : Glutathion disulfure.

H₂O : Eau.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HOCL : Acide hypochloreux.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.

LDL : Lipoprotéine de base densité.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogénase.

NOS : Nitric Oxide Synthase.

NO· : Oxyde d'azote.

OH· : Radical Hydroxyde.

ONOO⁻ : Ion peroxydite.

O₂^{-·} : Anion superoxyde.

O₂ : Oxygène.

¹O₂ : Oxygène singulet.

³O₂ : Oxygène triplet.

ROOH : Hydroperoxyde.

SOD : Superoxyde dismutase.

TCA : Acide trichloroacétique.

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Noms vernaculaires de <i>Mentha spicata</i> .	2
II	Classification botanique de <i>Mentha spicata</i> .	3
III	Composition chimique de <i>Mentha spicata</i> .	4
IV	les antioxydants enzymatiques.	12
V	Les principales classes des composés phénoliques.	15
VI	Le taux d'extraction de chaque extrait de <i>Mentha spicata</i> .	29

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	photo originale de <i>Mentha spicata</i>	3
02	principales voies de formation des radicaux libres	6
03	L'attaque des macromolécules par les ERO lors d'un stress oxydant	8
04	Lésions de l'ADN causées par les radicaux libres	9
05	Attaque radicalaire des protéines	9
06	Mécanisme de l'autoxydations des acides gras par l'oxygène	10
07	Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques	11
08	Structure chimique de l'acide Ascorbique	13
09	structures des tocophérols	13
10	la structure commune des polyphénols	14
11	Chélation des ions métalliques par les polyphénols	16
12	photo originale de la poudre des feuilles de <i>Mentha spicata</i>	18
13	Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux	19
14	Protocole de dosage des composés phénoliques.	21
15	Protocole de dosage des flavonoïdes	22
16	Protocole de dosage des tanins condensés	23
17	Réaction de réduction de DPPH en présence d'un antioxydant	24
18	Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH	24
19	Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS ^{•+} .	25
20	Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits de <i>Mentha spicata</i>	27
21	Protocole du test chélation de Fer	28
22	Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i>	30
23	Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i>	31
24	Histogramme représentant les teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i>	32
25	Activité scavenging du radical DPPH par les extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i> .	34
26	Activité scavenging du radical DPPH de l'extrait aqueux à différentes concentrations et celle des deux standards(acide ascorbique et la BHA).	35
27	Activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+} par les extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i> .	37
28	Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations de l'extrait aqueux et celle du standard Trolox.	38

29	Pouvoir réducteur des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i> .	39
30	pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA.	39
31	Représentation graphique du pouvoir chélateur du fer des extraits des feuilles de <i>Mentha spicata</i> .	41

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur <i>Mentha spicata</i>	2
I.1. Historique et origine.....	2
I.2. Habitat.....	2
I.3. Dénominations de la Menthe verte.....	2
I.4. Classification botanique.....	3
I.5. Description.....	3
I.6. Composition Chimique.....	4
I.7. Effets thérapeutiques et Activités Biologiques.....	5
II. Radicaux libres et antioxydants	6
II.1. Radicaux libres.....	6
II.1.1. Définition.....	6
II.1.2. Origine et production des radicaux libres.....	6
II.1.2.1. Mitochondrie.....	7
II.1.2.2. NADPH-Oxydase.....	7
II.1.2.3. Xanthine Oxydase.....	7
II.1.2.4. NO-Synthase (NOS).....	7

II.2. Stress Oxydant.....	8
II.2.1.Définition.....	8
II.2.2.Conséquences du stress oxydant.....	8
II.2.2.1.Oxydation d'ADN.....	8
II.2.2.2.Oxydation des protéines.....	9
II.2.2.3.Peroxydation lipidique.....	10
II.2.3.Maladies liées au stress oxydant.....	10
II.3. Antioxydants.....	11
II.3.1.Définition.....	11
II.3.2.Types d'antioxydants.....	11
II.3.2.1. Antioxydants enzymatiques.....	12
II.3.2.2.Antioxydants non enzymatiques.....	13
II.3.2.2.1.Vitamines.....	13
II.3.2.2.2.Oligoéléments.....	14
II.3.2.3.Composés phénoliques.....	14
II.3.2.3.1.Définition.....	14
II.3.2.3.2.Synthèse et classification des composés phénoliques.....	15
II.3.2.3.3.Mode d'action des composés phénoliques.....	16

Partie pratique

I. Matériels et méthodes.....	18
I.1.Préparation du matériel végétal.....	18
I.1.1.Récolte de la plante.....	18
I.1.2.Séchage et broyage.....	18
I.1.3.Tamisage.....	18
I.2.Extraction des composés phénoliques totaux.....	19

I.3.Dosage des composés phénoliques.....	20
I.3.1 Dosage des phénols totaux	20
I.3.2.Dosage des flavonoïdes.....	21
I.3.3.Dosage des tanins condensés.....	22
I.4.Activité antioxydante des extraits.....	23
I.4.1.Activité scavenging du radical DPPH.....	23
I.4.2.Evaluation de l'activité anti -radicalaire du radical-cation ABTS ^{•+}	25
I.4.3.Pouvoir réducteur.....	26
I.4.4. Chélation du Fer.....	27
I.4.5.Etude statistique.....	28
II. Résultats et discussion.....	29
II.1.Rendement de l'extraction.....	29
II.2.Teneurs en composés phénoliques.....	29
II.2.1.Teneurs en phénols totaux.....	29
II.2.2. Teneurs en flavonoïdes.....	31
II.2.2.Teneurs en tanins condensés.....	32
II.3.Activité antioxydant de <i>Mentha spicata</i>	33
II.3.1.Activité Scavenging du radical DPPH.....	33
II.3.2.Activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	36
II.3.3.Pouvoir réducteur.....	39
II.3.4.Chélation du fer.....	40
Conclusion et perspectives.....	42

Liste des références

Annexes

Introduction

Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales ont toujours occupé une place très importante en médecine vu leur capacité de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Ismaili et al., 2016**).

La recherche de ces dernières décennies a montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant (**Berger., 2006**) ; déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydant (**Bonnefont-rousselet et al., 2002**).

La majorité des plantes médicinales renferment des composés chimiques dotés de propriétés antioxydantes (**Benabdallah., 2016**). Le genre *Mentha* appartient à la famille des Lamiacées, constitué d'environ 25 à 30 espèces. Cette famille de plante est une source très riche en composés phénoliques et par conséquent ils pourraient posséder de fortes propriétés antioxydantes (**Kanatt et al., 2007**).

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante de l'espèce *Mentha spicata*.

Le but de la présente étude est d'examiner la capacité antioxydante des extraits de l'espèce étudiée et de rechercher les molécules actives.

Ce travail a été divisé en deux parties, une partie théorique et une partie pratique. la partie théorique englobe deux chapitres, des généralités sur *Mentha spicata*, les radicaux libres et les antioxydants ; alors que la partie pratique inclus deux chapitres, le premier est matériels et méthodes qui inclus les différents matériaux et techniques utilisées. Le second chapitre comporte résultats et discussions.

Synthèse bibliographique

I) Généralité sur *Mentha spicata* :

I-1)- Historique et origine :

La découverte et l'utilisation de la menthe verte remonte aux XIII^e et XVII^e siècles (av. J.-C). Les égyptiens ont utilisé cette plante pour la conservation des momies, probablement en raison de son fort arôme ; ils l'ont utilisée avec le myrte et le romarin durant les cérémonies funéraires, afin de masquer l'odeur des cadavres (**Bourgeois., 2009**).

L'origine de *Mentha spicata* est incertaine, mais elle s'agit probablement d'un hybride issu de *M. Longifolia L* et de *M. Suaveolens* (**Teuscher et al., 2005**).

I-2)- Habitat :

La menthe verte pousse essentiellement sur les terrains riches, profonds et frais .Elle n'aime pas les sols calcaires. On la trouve surtout à basse altitude dans les régions tempérées entre 400 et 1800 mètre .Elle préfère les lieux ensoleillés à semi ombragés (**Olivereau et Robouam., 2014**).

I-3)- Dénominations de la menthe verte :

Plusieurs noms vernaculaires ont été attribué à la menthe verte quelques uns sont rapportés dans le (Tableau I).

Tableau I : Noms vernaculaires de *Mentha spicata* (Teuscher et al., 2005).

Nom Français	Menthe verte ou Menthe douce
Nom Anglais	Spearmint, Green mint
Nom Allemand	Krauseminze, Grune Minze
Nom Kabyle et Arabe	Naanaa

I-4)- Classification botanique :

Parmi plusieurs classifications il existe celle qui est faite par (Bachman., 2016) présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau II).

Tableau II : Classification botanique de *Mentha spicata* (Benabdallah., 2017).

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha spicata</i>

I-5)- Description :

C'est une plante vivace sauvage ou cultivée, elle est souvent subspontanée .Les feuilles sont sessiles, opposées, à limbes gaufré muni de dents pointus, elles sont lancéolées de couleurs vert vif sur les deux faces (Abidjan .,2010).Les fleurs ,comportent un calice en forme de clochette , glabre ou ciliés ,divisé en 5 dents linéaires ;une corole violet pâle , rose ou blanche ,4 étamines saillantes de taille identique .La floraison a lieu de juillet à septembre (Figure n°1) ,(Teuscher et al., 2005) .



Figure : n°1 : Photo originale de *Mentha spicata*.

I-6) –Composition Chimique :

La composition chimique de la menthe verte est récapitulée dans le (Tableau III) :

Tableau III : Composition chimique de *Mentha spicata*.

Composés	Teneures	Références
Les huiles essentielles	<ul style="list-style-type: none"> • La L-carvone (40 à 80 %). • Limonène (5 à 15%). • Linalol (50 à 60%). • 1,8 –cinéole (20 %). • Menthone (8 à 10 %). • Un dérivé furanique, (1à2%) de menthofurane. 	(Teusher et <i>al.</i> , 2005).
Les composés phénoliques	<ul style="list-style-type: none"> - Acides phénoliques : Acide rosmariniques, acide caféique (60 à 80%), acide chlorogénique, acide vanilique, acide 4-hydrocinnamique, acide férulique et acide p-coumarique. - Les flavonoïdes : Diosmentine, acacétine, thymonine, sideritoflavone, apigénine, catéchine, lutéoline, rutine. - Tanins : Resveratrol stilbenoïde, Tyrosol phenylethanoïde. 	(Benabdallah., 2017).

➤ Autres composés :

En plus de l'huile essentielle et des composés phénoliques qu'elle contient la menthe verte renferme aussi environ : 4,8% de protéines, 0,6 % des lipides, 8 % de carbohydrates, 1,6% sels minéraux, 2% de fibres, 15,6 % de fer, 200mg de calcium ainsi que 6,04 mg de α -tocophérol (Chakravarty., 1976).

I-7) – Les effets thérapeutiques et Activités Biologiques :

La menthe verte est utilisée depuis fort longtemps comme plante médicinale on lui attribue presque toutes les vertus thérapeutiques reconnue aux menthes elle est anesthésique, analgésique et tonique générale et elle été rapportée aussi comme remède pour l'inflammation, les fièvres et les hémorragies .Elle est également traditionnellement utilisée contre les affections hépatiques, cardiaques et respiratoires (**Kee et al ., 2017**).

Ainsi, l'éventail des propriétés attribuées à cette espèce est assez large, d'où découlent quelques activités biologiques, parmi lesquelles, on peut citer :

➤ **Activité antibactérienne :**

Une étude faite par **Barchan et al ., 2016** à montrer une forte activité antibactérienne des extraits de *Mentha spicata* à une concentration de 12 mg/ml, testé sur des souches bactérienne (Gram+ et Gram-) par deux méthodes : diffusion en milieu solide et micro-délutions en milieu liquide.

➤ **Activité anti-inflammatoire :**

Arumugam et al., (2008) ont évalué, *in-vivo*, l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux du chloroforme, d'éthyle acétate et hexanique de l'espèce *M. spicata L.* Les deux extraits, aqueux et d'éthyle acétate sont les plus efficaces dans la réduction de l'inflammation aigue et chronique chez les rats.

➤ **Activité antioxydante :**

Une étude faite par **Javan., (2013)** à montrer que l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* permet l'inhibition du radical DPPH à une IC50 de 12 µg /ml par apport à la BHT qui présente une IC50 de 5 µg/ml ; ce qui fait que l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* présente une forte capacité antioxydant.

➤ **Toxicité :**

Aux doses usuelles la consommation de la menthe verte à des fins culinaires ou comme boisson aromatique ne présente aucun risque de toxicité ni aigue ni chronique ; son potentiel de sensibilisation est très faible. (**Teuscher et al ., 2005**).

Partie Pratique

II-1)- Les radicaux libres :

II-1-1)-Définition :

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al.*, 2007).

En biologie ; il existe deux sortes de radicaux libres : les ERO (espèces réactives de l'oxygène) tel que ($O_2^{\cdot-}$; H_2O_2 ; $HOCl$; OH^{\cdot} ; 1O_2 ) ; et les ERN (espèces réactives de l'azote) tel que (NO^{\cdot} ; $ONOO^{\cdot}$...) qui dérivent tous de l' O_2 (Tsumbu *et al.*, 2012).

II-1-2)- Origine et production des radicaux libres :

La plus part des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH et de l'activité de la Xanthine oxydase, alors que les espèces réactives de l'Azote sont essentiellement produites par la NO-synthase, comme c'est mentionné sur la (Figure n°2) (Berger ., 2006).

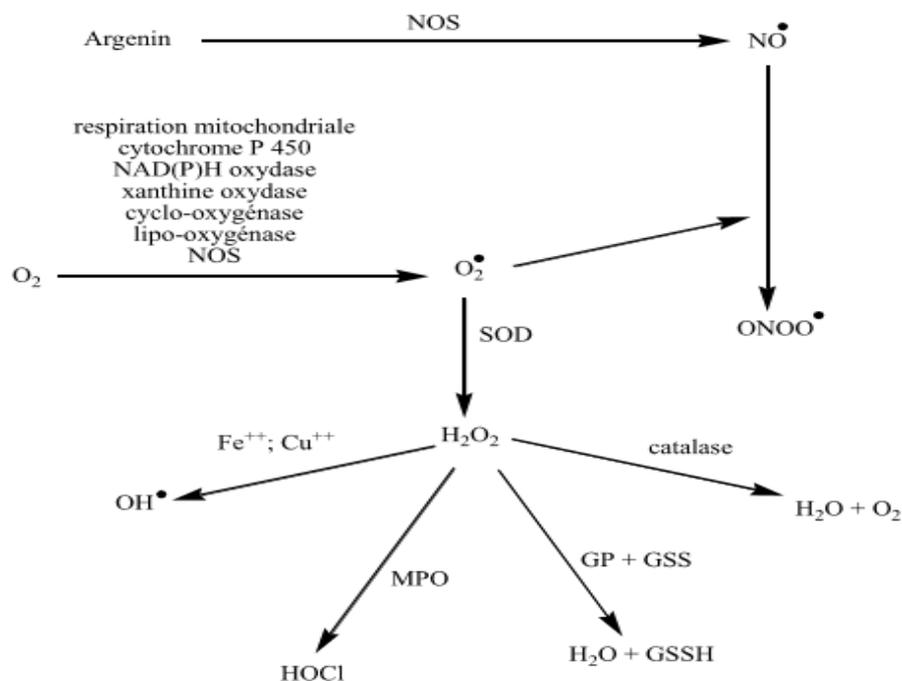


Figure n°2 : principales voies de formation des radicaux libres (Boubekri., 2014).

II-1-2-1)-La mitochondrie :

La mitochondrie est le siège majoritaire de la synthèse des radicaux superoxydes. Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles qu' $O_2\cdot$ et $HO\cdot$ (Lacolley., 2007).

II-1-2-2)-La NADPH-Oxydase :

Des études récentes ont montré que les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent une source majeure d'ERO, particulièrement, du radical superoxyde $O_2\cdot$ par transfert d'un électron sur l'oxygène (Bonfont-Rousselot et al., 2002).

II-1-2-3)-La xanthine Oxydase :

Elle oxyde l'hypo xanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique comme elle transfère chacun de ces deux électrons sur une molécule O_2 quelle réduit en $O_2\cdot^-$ (Tsumbu et al., 2012).

II-1-2-4)-La NO-Synthase (NOS) :

Les NOS catalysent la transformation de L-arginine en citrulline et produisent du monoxyde d'azote $NO\cdot$, appelé aussi oxyde nitrique (Tsumbu et al., 2012).

II-2)- Le Stress Oxydant :**II-2-1)-Définition :**

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki., 2006).

II-2-2)-Conséquences du stress oxydant :

Lors d'un stress oxydant, les ERO non détoxiquées par le système antioxydant attaque et endommagent les macromolécules contenues dans les cellules ; notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Figure n° 3), (Koechlin- Ramonatxo., 2006).

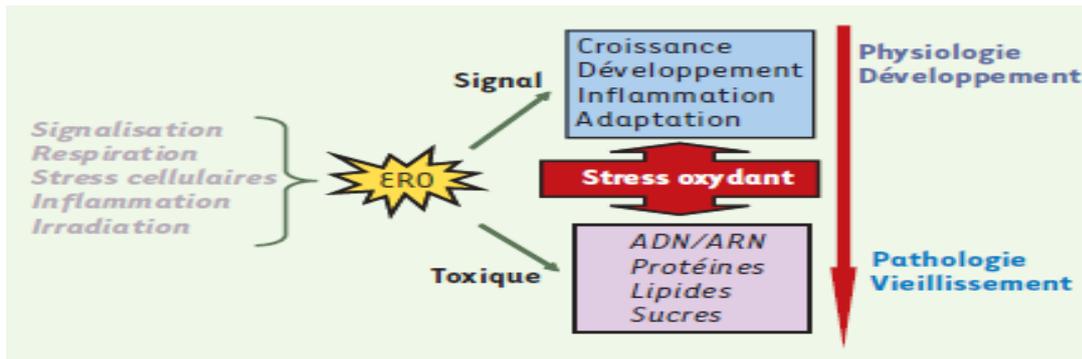


Figure n°3: L'attaque des macromolécules par les ERO lors d'un stress oxydant (Barouki., 2006).

II-2-2-1)-Oxydation d'ADN :

Les ERO attaquent l'ADN nucléaire et mitochondriale au niveau des bases azotées, qui sont très sensibles à l'oxydation. Le radical ($\text{OH}\cdot$) s'additionne sur les doubles liaisons de ces bases généralement en C5 et C8 et les oxyde. Un taux élevé de 8-oxo-guanine est un des principaux marqueurs d'agression oxydante dans l'ADN (Figure n°4) (Tsumbu *et al.*, 2012).

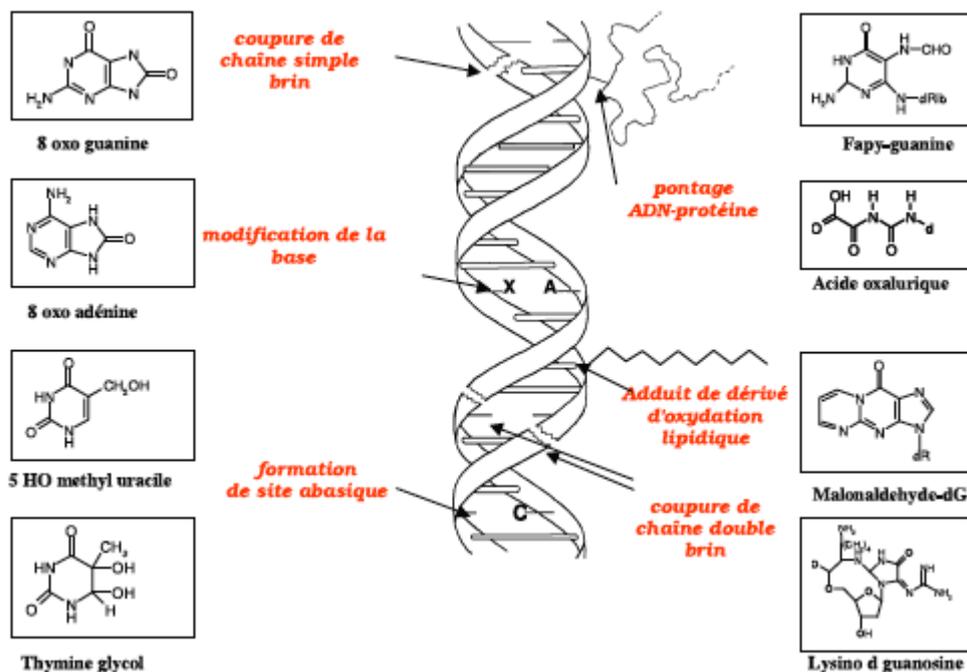


Figure : n°4 : Lisions d'ADN causées par les radicaux libres (Favier., 2003).

II-2-2-2)-Oxydation des protéines :

Les ERO oxydent les résidus aminoacides responsables des activités des protéines, en agissant sur les centres Fe-S de ces dernières, ou sur les métaux qu'elles complexent ;

de cette manière elles altèrent leurs structures entre autres en les dimérisant, et perturbent leurs fonctions (Figure n°5) (Tsumbu *et al.* , 2012).

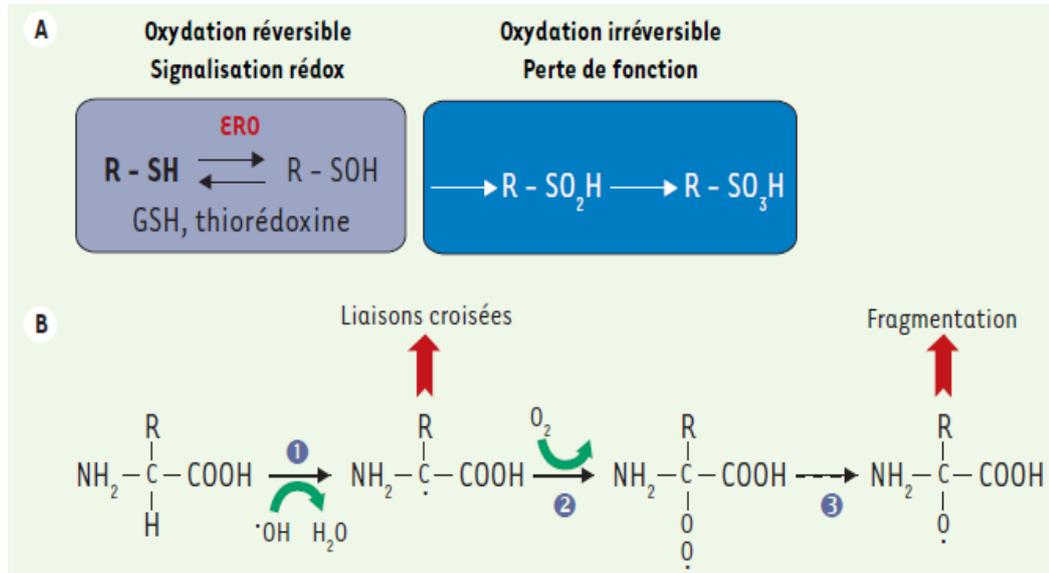


Figure : n°5 : Attaque radicalaire des protéines (Migdal., 2011).

II-2-2-3)-Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés (Cillard., 2006). L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydation en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information ((Koechlin-Ramonatxo ., 2006).

L'autoxydation des acides gras polyinsaturés par l'oxygène se déroule en trois étapes : initiation, propagation, terminaison, (Figure n°6).

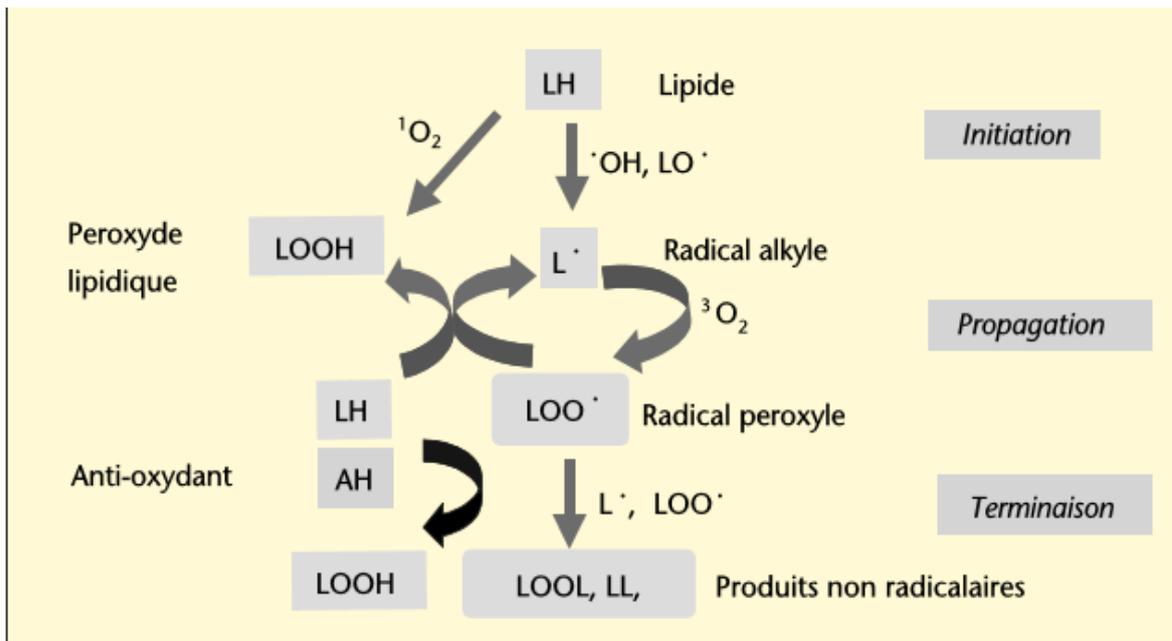


Figure n°6 : Mécanisme de l'autoxydation des acides gras par l'oxygène (Cillard., 2006).

II-2-3)-Maladies liées au stress oxydant :

Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par le stress oxydant sont impliquées dans le développement de différentes pathologies.

Ainsi, l'oxydation des lipides et de l'ADN est un facteur primordial dans l'augmentation des maladies cardiovasculaires et celle des cancers.

Le stress oxydant est également impliqué dans des affections aussi diverses que l'arthrite, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Enfin, il est aussi un mécanisme majeur dans le vieillissement physiologique, selon la théorie radicalaire (Koechlin-Ramonatxo., 2006).

II-3)- Les Antioxydants :

II-3-1)-Définition :

Un antioxydant (AOX) est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (Berger., 2006).

II-3-2)-Types d'antioxydants :

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique localisé dans les compartiments intra et extra cellulaire (Figure n°7), (Berger., 2006).

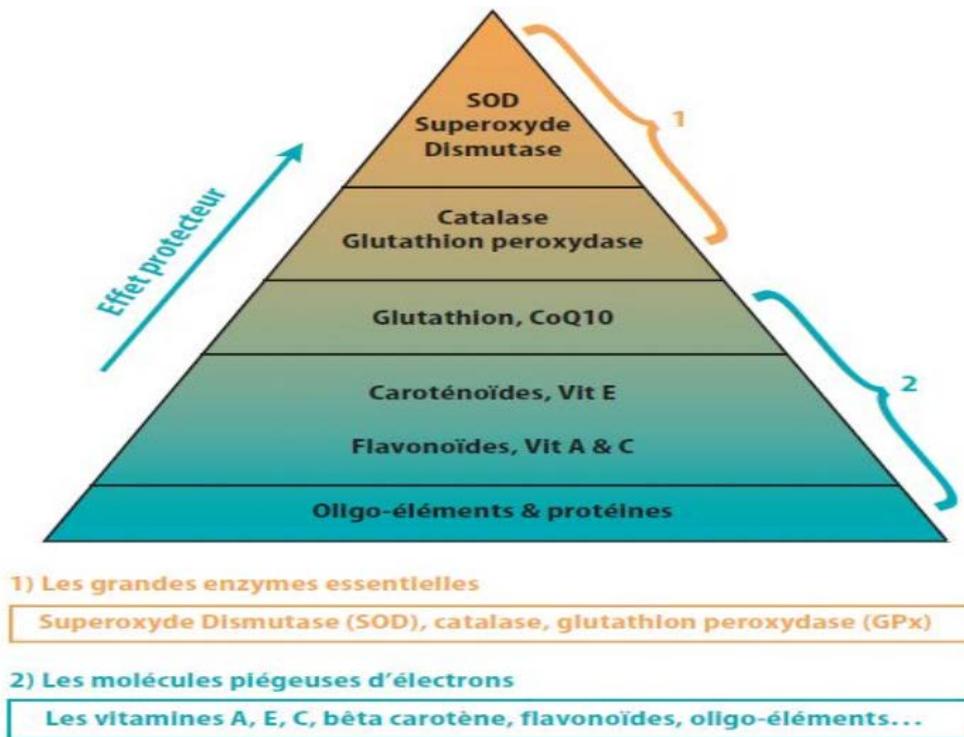


Figure n°7: Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg ., 2005).

II-3-2-1)- Les antioxydants enzymatiques :

Il existe différents types d'antioxydants enzymatiques, non enzymatiques et composés phénoliques.

Tableau IV : les antioxydants enzymatiques.

Enzymes	Mode d'action	Référence
Superoxyde-dismutase (SOD)	La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en dioxygène et H_2O_2 selon la réaction(1) : $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (1)	Afonso ., 2007
Catalase	Elle transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction (2) : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (2)	Tsumbu., 2012
Glutathion peroxydase (GPx)	L'enzyme catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène et des hydro peroxydes de type lipidique (ROOH) selon les réactions (3 et 4) : $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSH$ (3) $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H_2O + GSSH$ (4)	Tsumbu., 2012

II-3-2-2)- les antioxydants non enzymatiques :

II-3-2-2-1)-Les vitamines :

- Acide ascorbique :

C'est un désactivateur de l'oxygène singulet, il élimine aussi l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et aux radicaux tocophérols pour régénérer le tocophérol (Figure n°8) (Cillard., 2006).

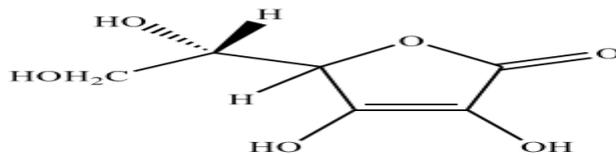


Figure : n°8 : Structure chimique de l'acide Ascorbique (Boubekri., 2014).

- La β - Carotène :

Les caroténoïdes sont les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet (réaction 5) (Laguerre et al., 2007).



- La vitamine E (L' α -tocophérol) :

Il est présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande. Il neutralise les radicaux pyroxyles, alkyles et alcoxyles, (Figure n°9) (Annahazi et al., 2007).

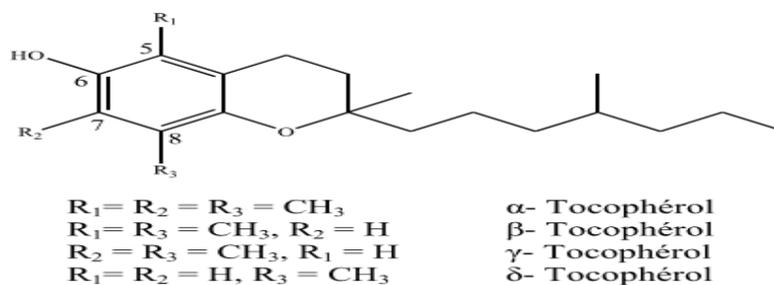


Figure 9 : Structure des tocophérols (Boubekri., 2017).

II-3-2-2-2)-Les oligoéléments :

- Le sélénium :

Le sélénium est le cofacteur de la GPx qui favorise l'élimination des lipides oxydés. Il joue aussi un rôle primordial dans le maintien d'une bonne immunité tout en étant le cofacteur d'autres enzymes impliquées dans le fonctionnement de la thyroïde (**Pincemail et al., 2009**).

- Le cuivre :

C'est un cofacteur d'enzymes comme la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. (**Haleng et al., 2007**).

- Le zinc :

Il joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes, il intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines. Il peut inhiber les réactions de formation des ERO (**Haleng et al., 2007**).

II-3-2-3)-Les composés phénoliques :

II-3-2-3-1)-Définition :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (Figure n°10) (**Boizot et Charpentier., 2006**).

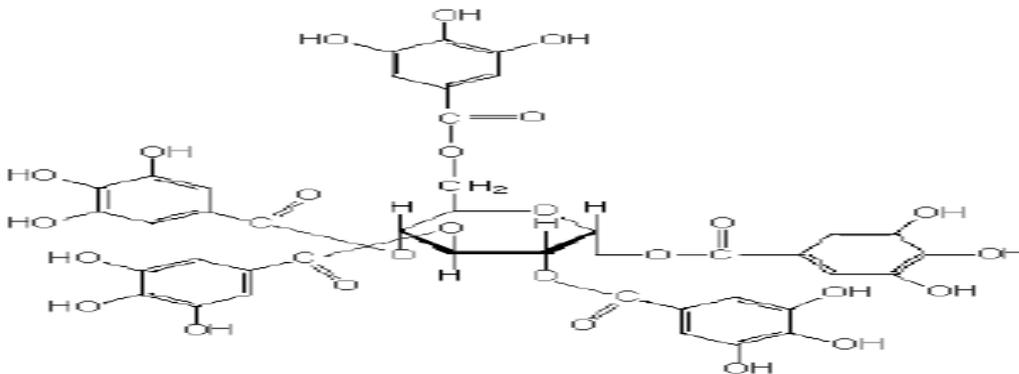


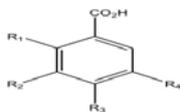
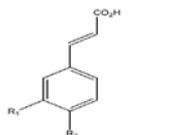
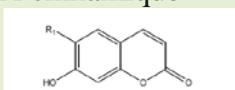
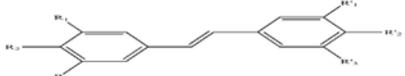
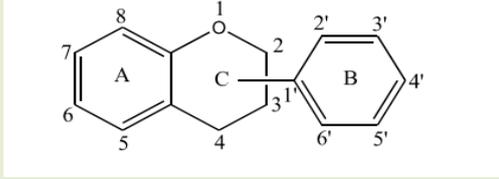
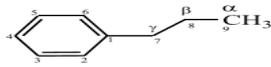
Figure n°10: la structure commune des polyphénols (Vattem et al., 2005).

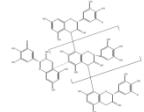
II-3-2-3-2)-Synthèse et classification des composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant après trans-amination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou poly acétates (malonate)

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre de l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique, (Tableau V), (Chira et al., 2008).

Tableau V: Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri., 2014).

Squelette carbonée	Classe	Structure
C6	Phénol simple	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	
C6-C3	-Acides cinnamique	hydrox 
	-Coumarines	A cinnamique  Coumarines
C6-C2-C6	Silènes	
C6-C3-C6	Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanols Flavanones Isoflavonols	
(C6-C3)2	Lignanés	

(C6-C3) n	Lignines		
(C15) n	Tanins		
		Tannins condensés	Tannins hydrolysables

II-3-2-3-3)-Mode d'action des composés phénoliques :

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydant via plusieurs mécanismes :

- Le piégeage direct des ERO.
- L'inhibition des enzymes génératrices d'ERO.
- La chélation des ions de métaux de transitions (Achat., 2013).

➤ Chélation des ions métalliques :

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe^{2+} pour la Catalase et (Cu^+ pour le superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical OH^\bullet par la réduction de H_2O_2 lors de la réaction de Fenton (Achat., 2013).

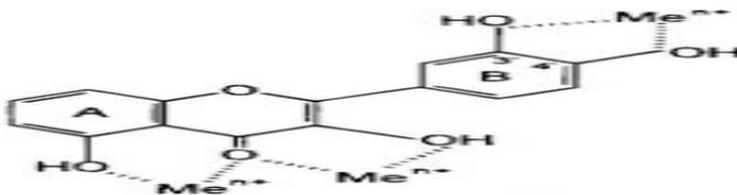
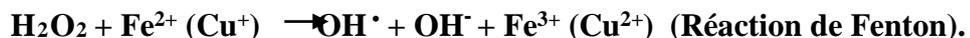
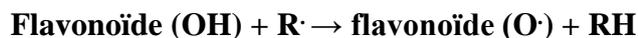


Figure n°11 : Chélation des ions métalliques par les polyphénols (Pietta., 2000).

➤ **Piégeage des radicaux libres :**

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydants en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire, ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres (**Boubekri., 2014**).

➤ **Inhibition des enzymes :**

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols.

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines, via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs (**Achat., 2013**).

I-Matériel et méthodes :

I-1-Préparation du matériel végétal :

Notre étude a porté sur une espèce de plante de la famille des *Lamiaceae* qui est *Mentha spicata*.

I-1-1-Récolte de la plante :

Mentha spicata L a été récolté en Mars 2018 de la région Biyou, Commune de Boukhlifa, wilaya de Bejaïa ; loin de tout impact de pollution.

I-1-2-Séchage et broyage :

Les feuilles de *Mentha spicata* fraîchement collectées ont été conservées à l'ombre dans un endroit aéré pendant 10 jours, ensuite elles ont été séchées dans une étuve à 40°C durant 24h et à l'aide d'un broyeur électrique, les feuilles ont été broyées en poudre très fine dans le but de faciliter l'extraction, (Figure n°12).



Figure n°12 : photo originale de la poudre des feuilles de *Mentha spicata*.

I-1-3-Tamisage :

La poudre obtenue suite au broyage a été tamisée à l'aide d'un tamis ayant un diamètre de 125 μm , pour récupérer à la fin une poudre très fine.

La poudre a été, ensuite, conservée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière.

I-2-Extraction des composés phénoliques totaux :

a)-Protocole d'extraction :

Le procédé d'extraction des polyphénols utilisé est celui décrit par (Chiang *et al.*,1994) ayant subi quelques modifications, qui est schématisé dans la (Figure n°13). Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant trois solvants de différentes polarités : l'éthanol, l'eau et le chloroforme. Toutes les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à des températures ambiantes.

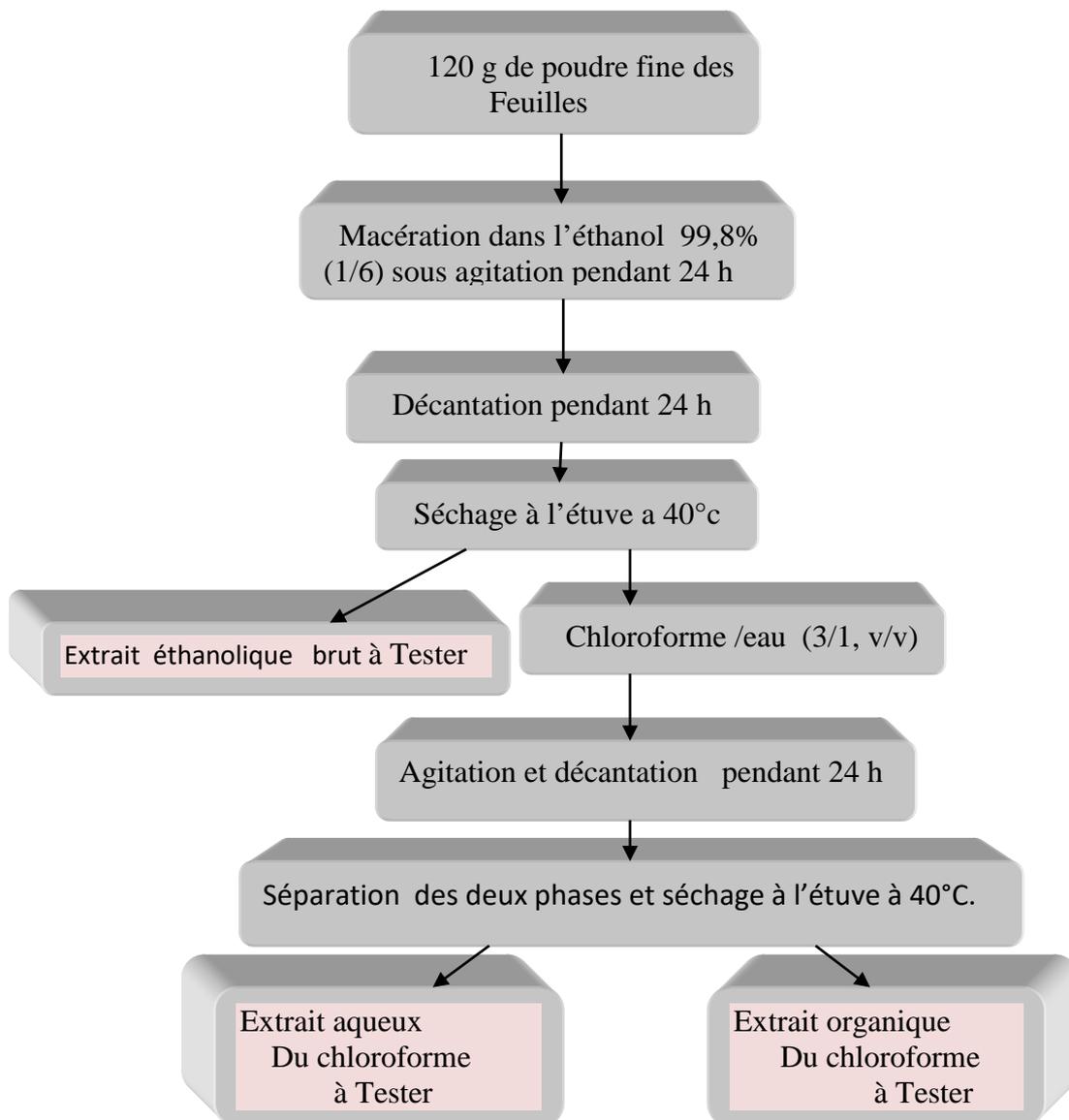


Figure : n°13: Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux (Chiang *et al.*,1994).

b) Calcul du rendement :

Après l'extraction, trois extraits ont été obtenus. Le taux d'extraction de chaque extrait a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P - P_0)/\text{poids de la poudre}] \times 100$$

Où :

P₀ : Poids vide du creuset.

P : poids après évaporation du solvant.

I-3)- Dosage des composés phénoliques :

Le dosage des composés phénoliques de cette plante a été fait tout en suivant trois protocoles nous permettons de déterminer les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

I-3-1)- Dosage des phénols totaux :**a) Principe :**

Le dosage des polyphénols se fait par la méthode de folin-ciocalteu. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent le réactif de folin-ciocalteu en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleue. L'intensité de cette couleur bleue renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Khadhri *et al.*, 2013).

b) Protocole :

Le dosage des composés phénoliques totaux à été fait selon le Protocole de (Yap *et al.*, 2009), qui est schématisé dans la (Figure n°14).

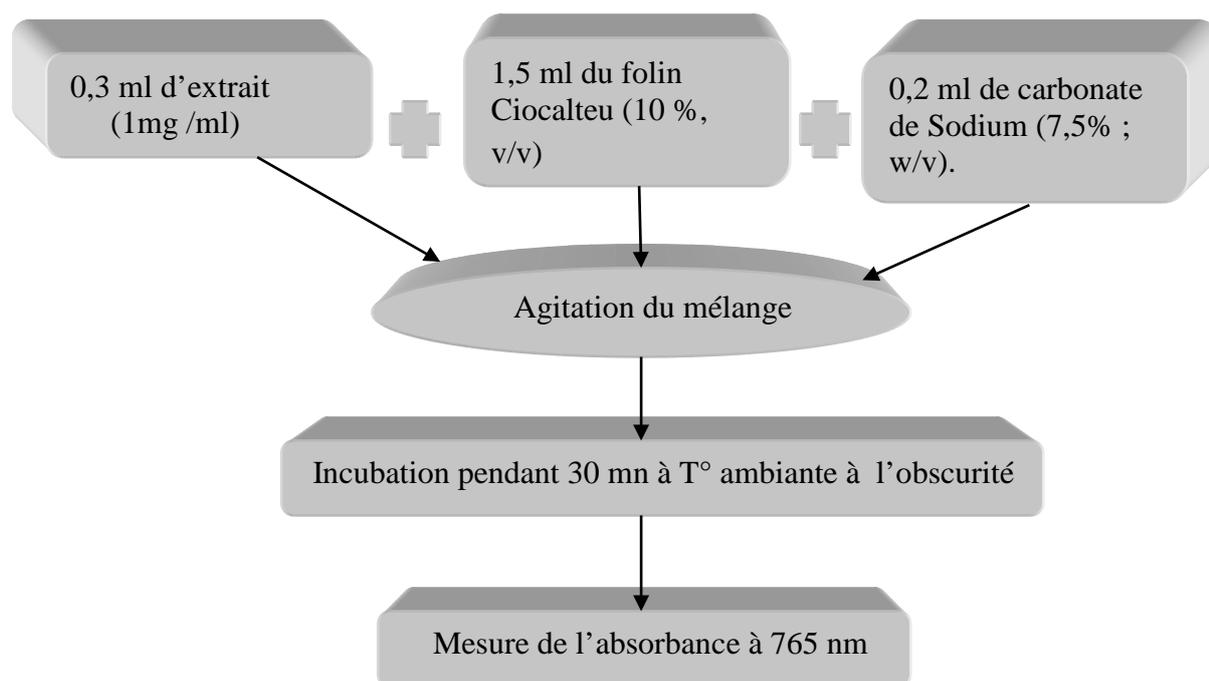


Figure : n°14 : Protocole de dosage des composés phénoliques.

N.B : un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

I-3-2)- Dosage des flavonoïdes :

a) Principe :

La quantité des flavonoïdes a été estimée par la méthode colorimétrique en utilisant une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Le dosage est basé sur la formation d'un complexe coloré (jaune) entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium qui absorbe à une longueur d'onde 430 nm. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la concentration des flavonoïdes contenus dans les extraits (Benabdallah., 2017).

b) Protocol :

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode de (Abdou Boubou *et al.*, 2010), ayant subi quelques modifications. Toutes les étapes du Protocol sont schématisées dans la (Figure n° 15).

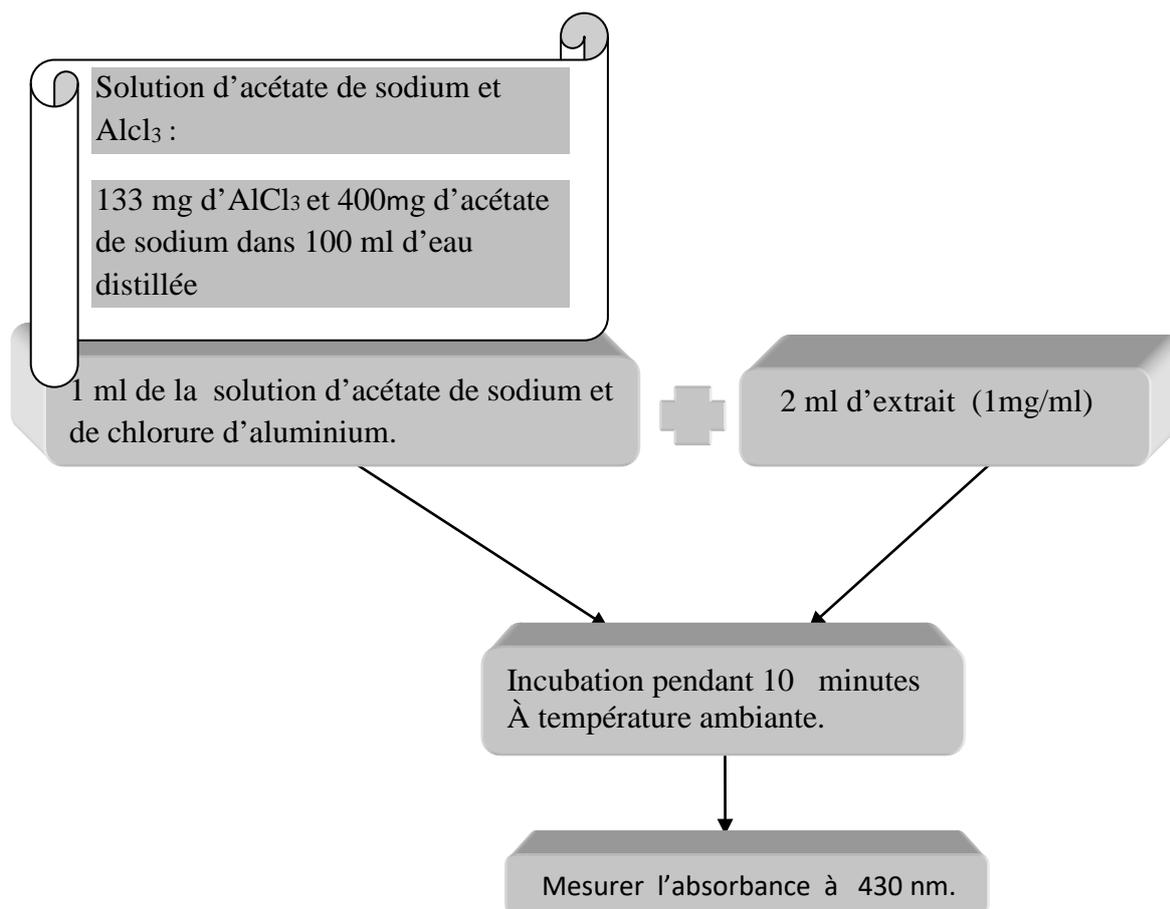


Figure n°15 : Protocole de dosage des flavonoïdes.

N.B. : Un blanc a été préparé pour chaque extrait en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

I-3-3)- Dosage des tanins condensés :

a) Principe :

Les tanins condensés sont dosés en présence d'acide sulfurique concentré. Ils se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline, se transforment en Anthocyanidols de couleur rouge spécifique, mesurable par spectrophotométrie à 500 nm (Khadhri et al., 2013).

b) Protocol

La teneur en tanins condensés (proanthocyanidines) est déterminée selon la méthode de (Sun et al., 1998) cité par (Oyedemi et Afolayan., 2011) avec quelques modifications. Le protocole utilisé est résumé dans la (Figure n° 16).

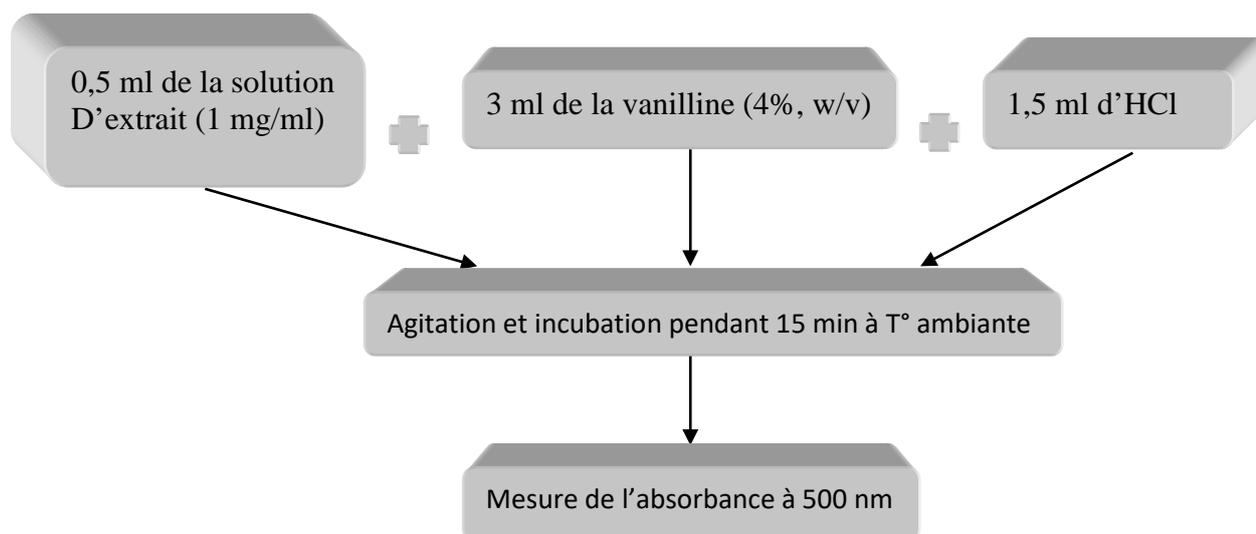


Figure : n°16 : Protocole de dosage des tanins condensés.

N.B : Un blanc d'extrait a été préparé pour chaque extrait, contenant 0,5 ml de solution d'extrait, 3ml du méthanol et 1,5ml d'Hcl.

I-4-Activité antioxydante des extraits :

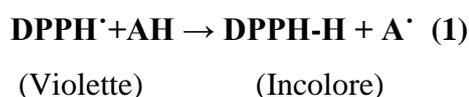
L'activité antioxydante est la capacité d'un composé d'inhiber la dégradation oxydative (Roginsky V et Lissi E.A., 2005).

Dans ce travail il y a quatre tests qui ont été mise en œuvre pour la mesure de l'activité antioxydant : test de l'activité scavenging des radicaux DPPH[•], ABTS^{•+}, test du pouvoir réducteur et de l'activité chélatrice du fer.

I-4-1-Activité scavenging du radical DPPH[•] :

a) Principe :

Le DPPH (2,2-diphényle-1-picryl hydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants, ce qui explique le changement de sa couleur en jaune. Ce virage de couleur explique le pouvoir de l'extrait de plante à piéger ce radical qu'on peut détecter par spectrophotométrie à 517 nm (réaction 1), (Figure n°17) (Ghazghazi et al., 2013).



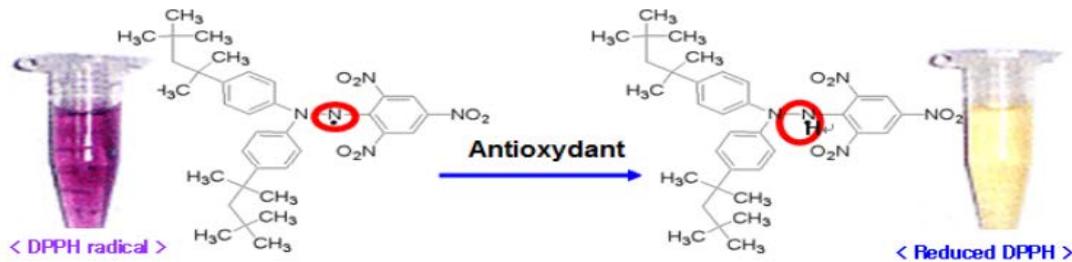


Figure n°17 : Réaction de réduction de DPPH en présence d'un antioxydant (Benabdallah, , 2017).

b) Protocol:

L'effet « scavenger » des extraits de *Mentha spicata* L. vis à vis du radical DPPH a été mesuré selon le protocole de (Hemalatha et al., 2010) représenté dans la (Figure n°18).

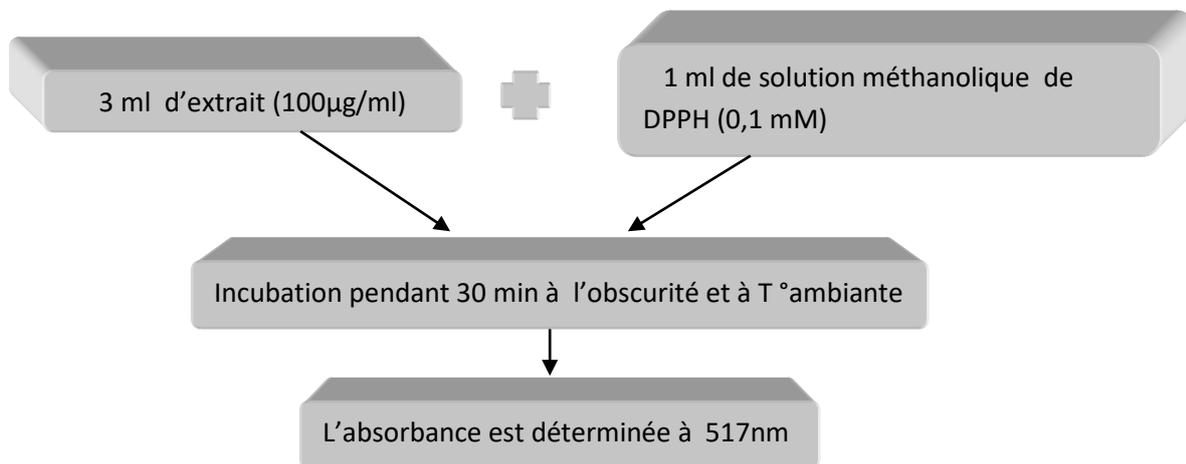


Figure : n°18: Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH.

c) Expression des résultats :

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante :

Où :

$$\% \text{ scavenging du radical DPPH} = (Ac - (At - Ab) / Ac) \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol).

At : Absorbance du teste (échantillon +DPPH).

Ab : Absorbance du blanc du teste (échantillon+méthanol).

I-4-2)-Evaluation de l'activité anti-radicalaire du radical-cation ABTS^{•+} :

a)-Principe :

Le radical cation de l'acide 2,2-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre. Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. D'autres oxydants peuvent être utilisés, tels que le dioxyde de manganèse (MnO₂). Ce radical est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges Complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants classiques de Type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Nadal ., 2009).

b)-Protocole :

Le protocole suivi pour cette étude est celui décrit par (Le et al., 2007) ayant subi quelques modifications. Toutes les étapes du test sont résumées dans la (Figure n°19).

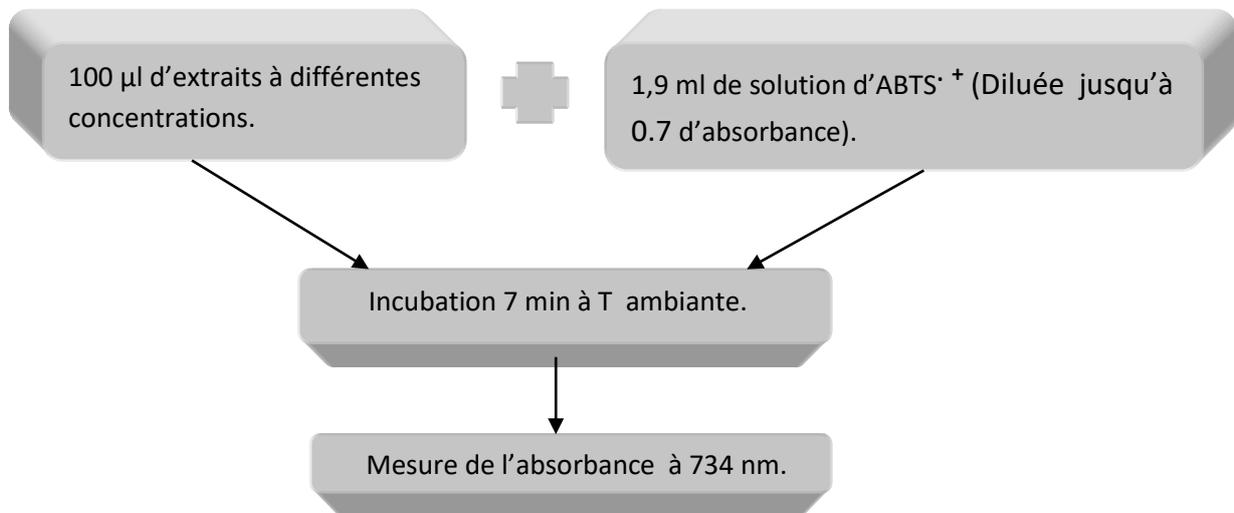


Figure : n°19 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS^{•+}.

c) Expression des résultats :

Le pourcentage d'activité scavenging du radical ABTS^{•+} a été calculé selon la l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire du radical-cation ABTS}^{\bullet+} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

Où : **A_c** : absorbance du contrôle.

A_t : absorbance du test.

I-4-3- Le pouvoir réducteur :

a)- Principe :

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer, le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduits en Fe^{2+} par les Antioxydants présents dans l'extrait végétal (Khadhri et al., 2013).

b)-Protocole :

Le pouvoir réducteur des extraits de *Mentha spicata* L. a été déterminé selon le protocole (d'Oyaïzu., 1986) cité par (Ogunlana et Ogunlana., 2008) avec quelques modifications, (Figure n°20).

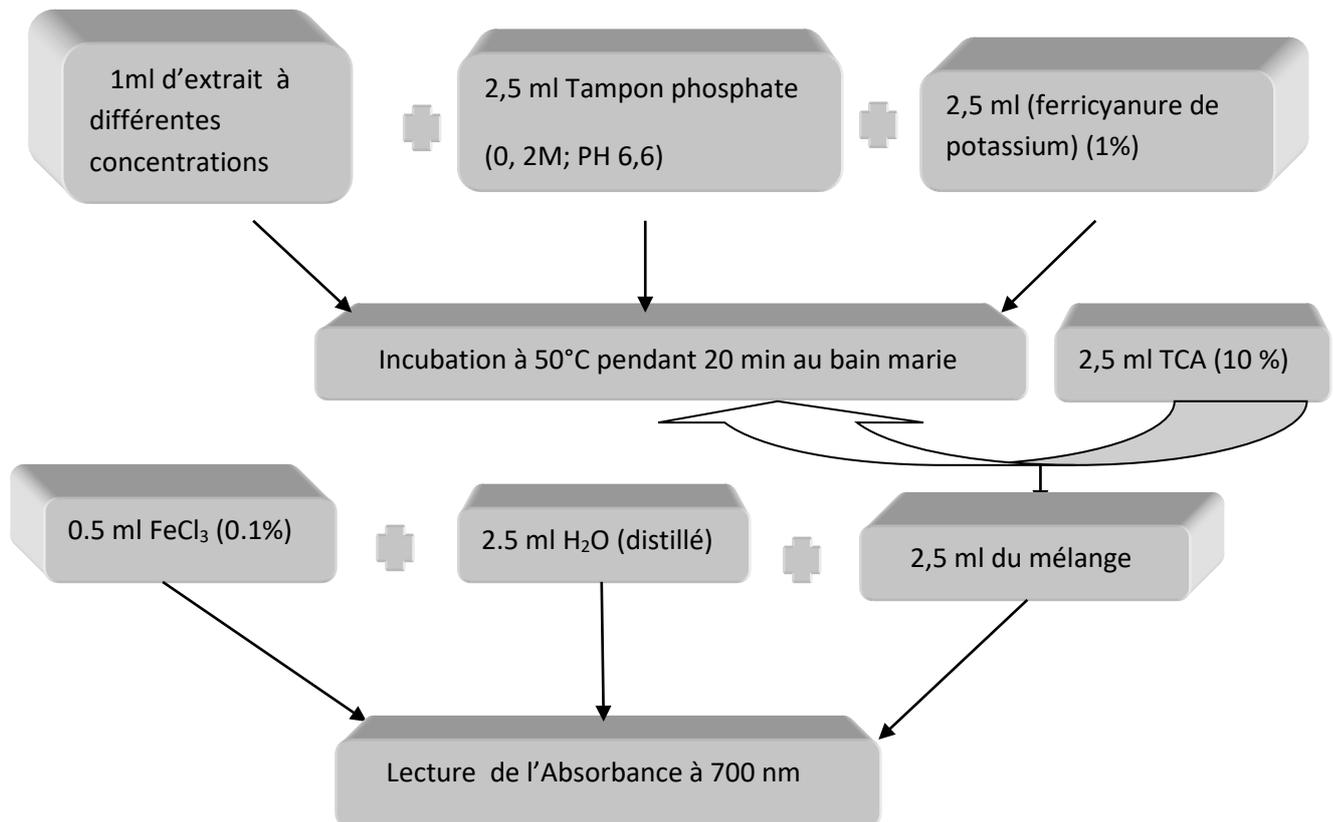


Figure : n° 20 : Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits de *Mentha spicata*.

N.B : Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol, et la BHA a été utilisée comme standard.

c) Expression des résultats :

Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

I-4-4)- La Chélation du Fer :**a) Principe :**

Pour évaluer *in vitro* le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine. En effet, la ferrozine forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe (ferrozine-Fe²⁺) de couleur violette intense.

La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à piéger cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur de l'extrait n'est important (**Khadhri et al., 2013**).

b) Protocol :

Le protocole suivi pour cette étude est celui décrit par (**Dinis et al., 1994**) ayant subi quelques modifications. Toutes les étapes du test sont résumées dans la (Figure n°21).

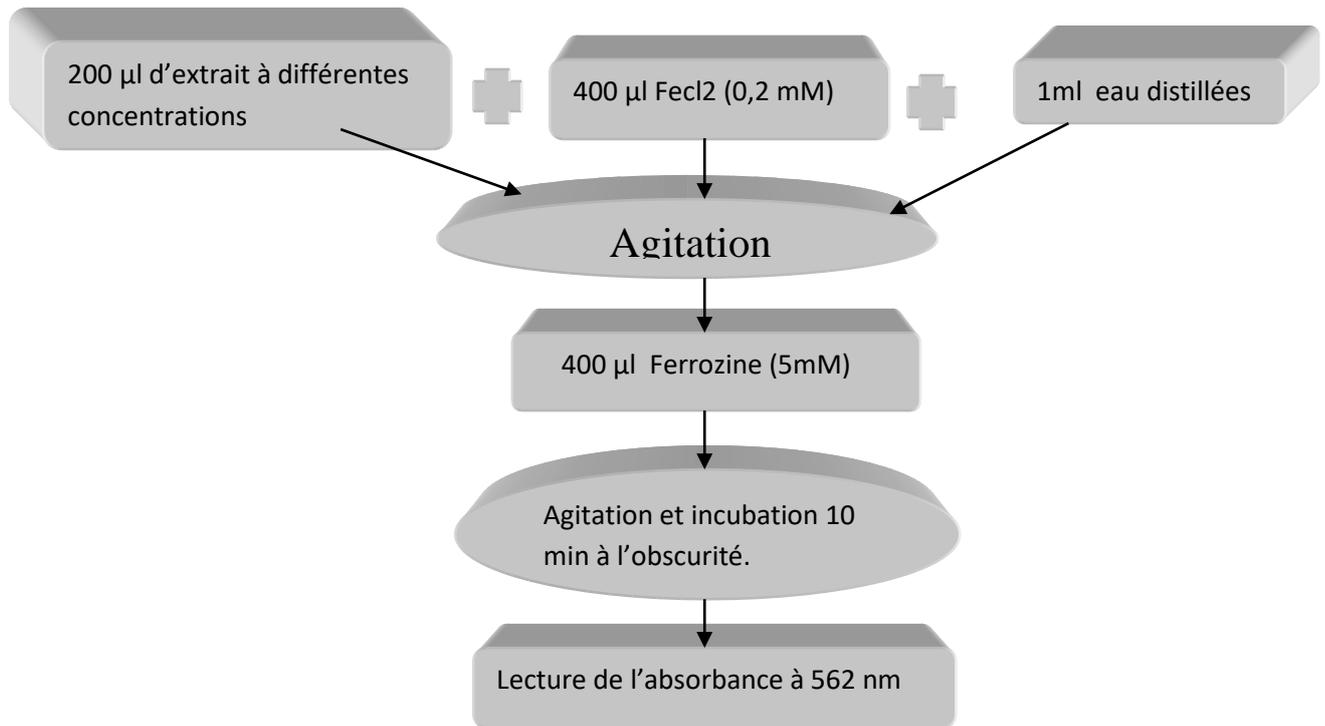


Figure : n° 21 : Protocole du test chélation de Fer.

I-4-5)-Etude statistique :

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

II)- Résultat et discussions :

II-1) – Rendement de l'extraction :

Les rendements des trois extraits des feuilles de *Mentha spicata* ont été calculés et les résultats sont représentés dans le Tableau VI.

Tableau n°VI : Le taux d'extraction de chaque extrait de *Mentha spicata*.

Extraits	Rendement %
Extrait éthanolique brute	4,64 %
Extrait organique du chloroforme	55,08 %
Extrait aqueux du chloroforme	20,76 %

Ce tableau montre que le rendement de l'extrait éthanolique est légèrement faible par rapport à d'autres plantes et que c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné le rendement le plus élevé par rapport à l'extrait aqueux du chloroforme. Cela pourrait indiquer la richesse des feuilles de cette plante en composés de polarité réduite tel que les huiles essentielles.

II-2)- Dosage des composés phénoliques :

II-2-1)- Dosage des phénols totaux :

Les résultats du dosage des phénols totaux de nos extraits, exprimés en mg équivalent acide gallique /g d'extrait, sont représentés dans la (figure 22) ci-dessous :

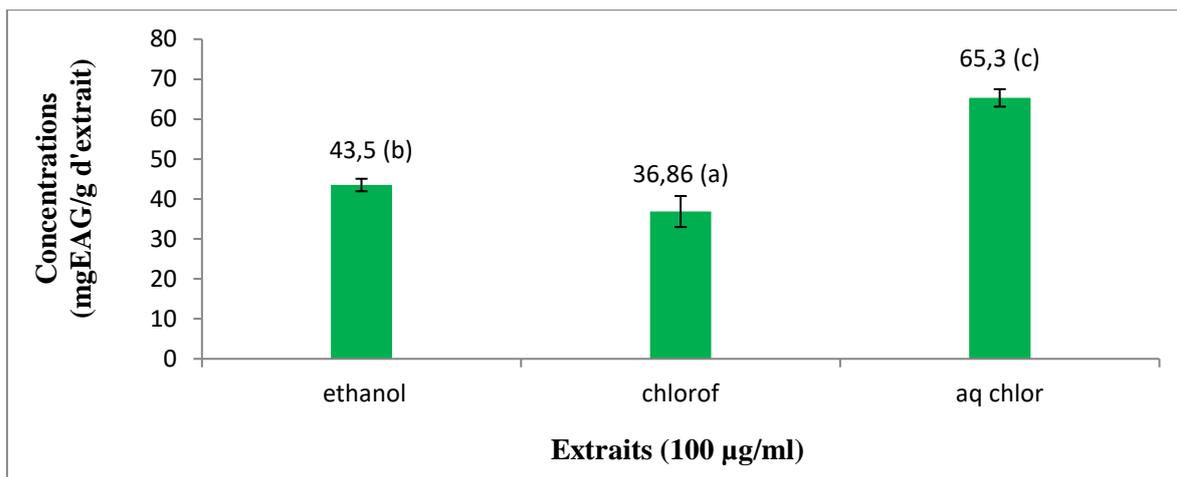


Figure n°22 : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

Une vue d'ensemble de la figure 21 nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux de *Mentha spicata* sont comprises entre $65,3 \pm 2,19$ et $38,86 \pm 3,88$ (mg équivalent acide gallique / g d'extrait) ce qui montre la richesse de cette plante en phénols totaux.

Une étude réalisée par **Fletcher et al., (2005)** a montré la teneur allant de 51 à 73 mg/g d'un extrait des feuilles de *Mentha spicata* (récoltée en 5 périodes différentes), ce résultat confirme les résultats issus de notre travail.

De même le résultat de l'étude faite par **Abootalebian et al., (2016)** est en accord avec les résultats de notre étude (50,1 à 67,2 mg équivalent acide tannique / g d'extrait sec).

En revanche, **Brahmi et al., (2015)** ont trouvé une concentration en phénols totaux de $12 \pm 0,3$ mg équivalent acide gallique / g d'extrait comme teneur en phénols totaux ce résultat est très faible comparé aux nôtres ; ceci peut être expliqué par la différence de la méthode d'extraction et du poids de la poudre utilisée (25g seulement).

On outre, nous constatons que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné la concentration en phénols totaux la plus élevée, étant donné que les phénols totaux sont des composés hydrosolubles ; vu leur richesse en groupement hydroxyles donc se solubilisant dans des solvants polaires (**Kanatt et al., 2007**).

Il est à noter que l'extrait éthanolique brut a donné une quantité un peu plus faible que celle de l'extrait aqueux du chloroforme et cela serait dû à la richesse de ce dernier en

composés phytochimiques ce qui engendrerait un encombrement stérique qui empêcherait la révélation de la totalité des phénols totaux par le réactif Folin-Ciocalteu.

En fin l'étude statistique, montre que la teneur en phénols totaux de l'extrait aqueux du chloroforme est significativement supérieure à celle de l'extrait brut mais aussi qu'elle est significativement supérieure à celle de l'extrait organique du chloroforme ($\alpha < 0,05$).

II-2-2)- Dosage des flavonoïdes :

La Figure 23 illustre les teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de *Mentha spicata*. Exprimées en mg équivalent Quercétine /g d'extrait.

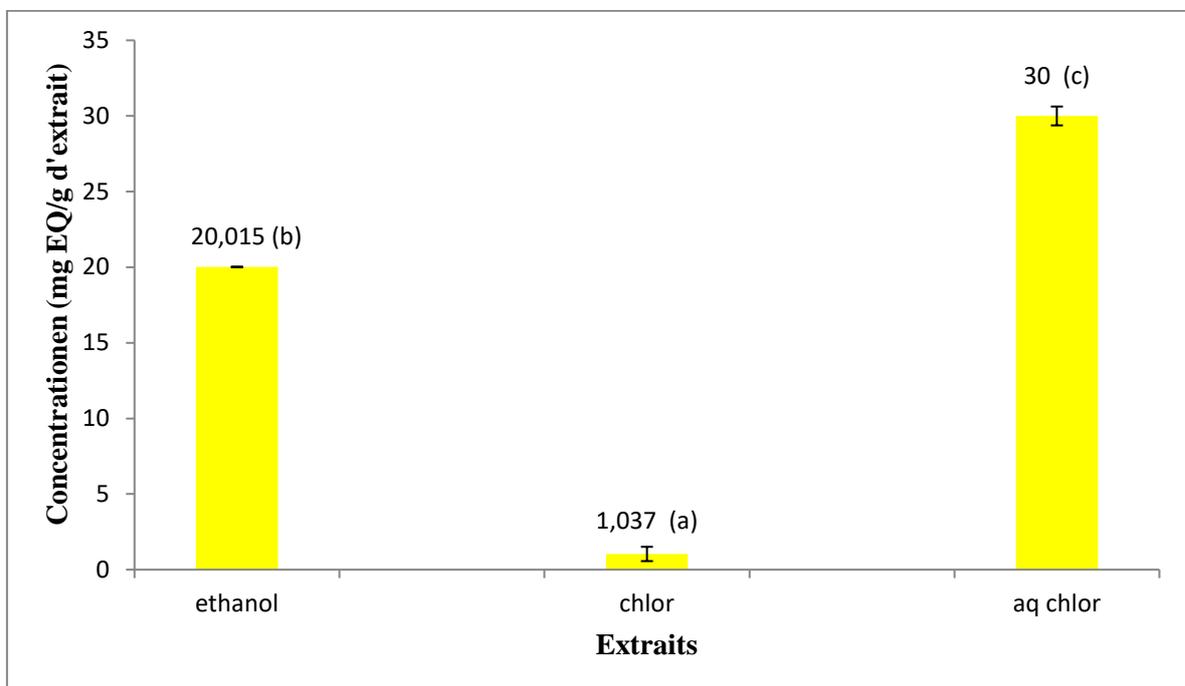


Figure n°23 : Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

Nous remarquons d'après la figure 23 que les extraits des feuilles de *Mentha spicata* contiennent des teneurs appréciables en flavonoïdes qui sont comprise entre $1,037 \pm 0,47$ et $30 \pm 0,62$ (mg équivalent quercitrine /g d'extrait).

En effet la teneur en flavonoïdes d'un extrait des feuilles de *Mentha spicata* était de $1,786 \pm 0,153$ d'après l'étude faite par **Systar et al .,(2016)**, et ce résultat est très proche de la teneur en flavonoïdes donné par l'extrait organique du chloroforme de notre étude qui est de $1,037 \pm 0,47$.

Par ailleurs, une autre étude faite par **Kanatt et al ., (2007)** a présenté une concentration en phénols totaux de $13,5 \pm 1,38$ mg/g d'extrait ; cette teneur est dans ce cas voisine à celle de l'extrait brut de notre plante.

Nous constatons également que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné la teneur la plus élevée étant donné que les flavonoïdes sont des petites molécules hydrosolubles riches en groupements hydroxyles se solubilisant donc dans les solvants polaire.

Nous notons également que l'extrait éthanolique brut a donné une teneur légèrement inférieure à celle de l'extrait aqueux du chloroforme et cela s'expliquerait par la présence de plusieurs composés phytochimiques dans l'extrait éthanolique ce qui engendrerait un encombrement stérique et empêcherait ainsi la formation du complexe jaunâtre entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et le chlorure d'aluminium.

D'après l'étude statistique nous constatons que la teneur en flavonoïdes de l'extrait organique du chloroforme est significativement très inférieure par à celle des deux autres extraits ($\alpha < 0,05$).

II-2-2)-Dosage des tanins condensés :

Les résultats du dosage des proanthocyanidines de notre étude sont présentés dans la (Figure 24) :

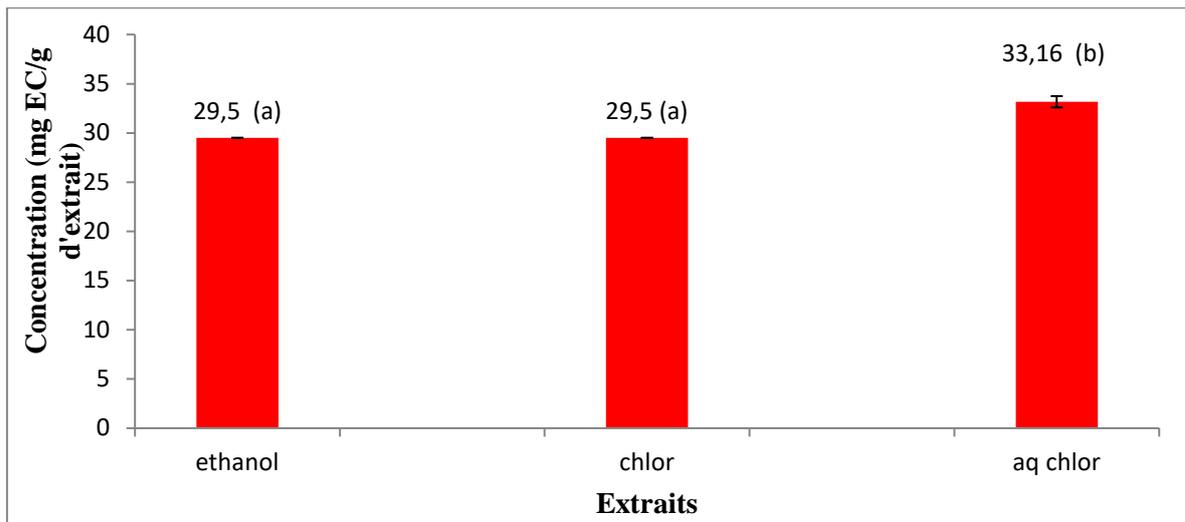


Figure n°24 : Histogramme représentant les teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

Cette représentation graphique nous permet de déduire que notre plante est pauvre en tanins condensés et les teneurs sont comprises entre 29,5 et 33,16 (mg équivalent catéchine / g d'extrait). Ceci est en accord avec l'étude effectuée par **Ben Saad et al. ,(2017)** qui ont trouvé une concentration en tanins condensés de $9,3 \pm 0,45$ mg EC/g d'extrait.

Une autre étude faite par **Benabdallah et collaborateurs ., (2016)** a donné une quantité de $2,71 \pm 0,1$ qui est très faible également.

À partir de la figure 24 on remarque aussi que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a présenté la teneur en proanthocyanidines la plus élevée ($33,16 \pm 0,57$ mg EC/g d'extrait) et cela serait dû à la complexité des polymères de ces composés et surtout à leur richesse en groupement(OH) qui se solubilisent dans des solvants polaire.

L'étude statistique nous montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux extraits (éthanolique et organique du chloroforme), mais elle nous permet de voir que la teneur donnée par l'extrait aqueux du chloroforme est significativement supérieure à celles de ces deux derniers ($\alpha < 0,05$).

II-3)- Activité antioxydante de *Mentha spicata*

II-3-1)- Activité Scavenging du radical DPPH :

L'activité scavenging du radical DPPH a été évaluée par le spectrophotomètre suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm (**Ghazghazi et al .,2013**).

Les résultats de cette activité, des standards et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure ci- dessous (Figure 25) :

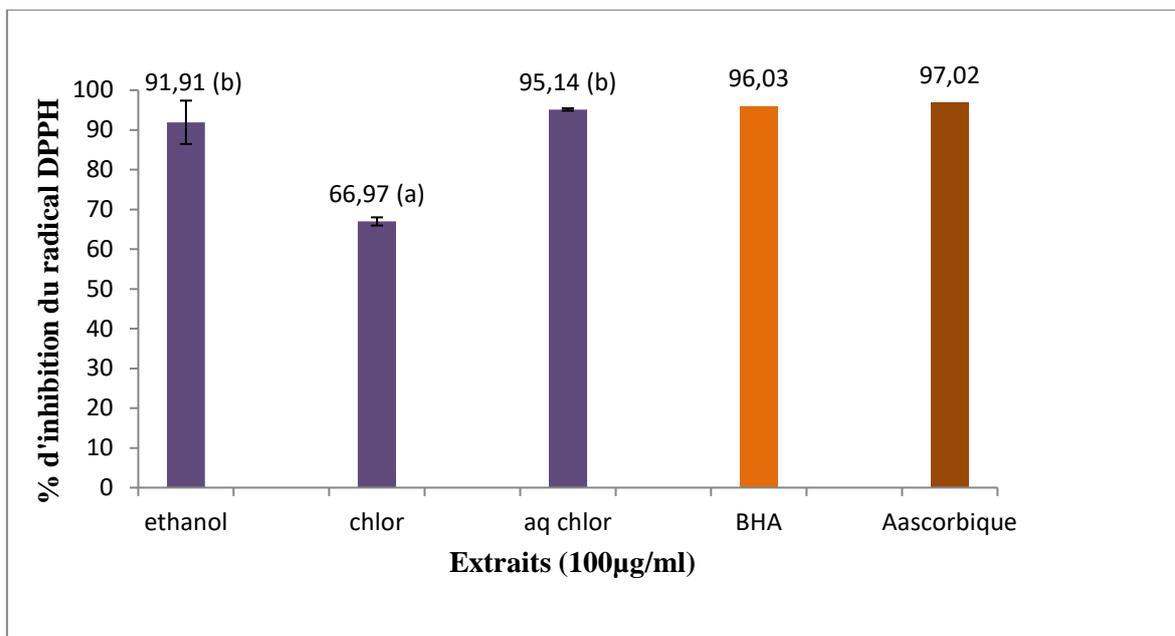


Figure n°25 : Activité scavenging du radical DPPH par les extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

Tous comme on peut le remarquer, les extraits ont exhibés une activité scavenging du radical DPPH très élevé à 100g/ml en comparaison aux pourcentages d'inhibitions (97,02 et 96,03) présentés par les standards (acide Ascorbique et BHA) respectivement. En effet ces résultats sont en accord avec le résultat (71%), présenté par (Ahmad et al., 2012).

Par ailleurs, l'étude de Hosseinimehr et al., (2007) a exhibée un pourcentage de 88,7% \pm 1,5 ce qui est presque le cas des résultats des résultats donné par nos échantillons.

En outre, nous constatons que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a montré le pourcentage d'inhibition du radical DPPH le plus élevé comparativement aux deux autres extraits ceci pourrait être expliqué par sa richesse en composés phénoliques (phénols totaux ; flavonoïdes et tanins condensés) qui sont riches en groupement hydroxyles donneurs d'électron et d'hydrogène.

En effet il existe une bonne corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et les teneurs en composés phénoliques de nos extraits (phénols totaux : R= 0,96 ; flavonoïdes : R= 0,78 ; tanins condensés : R= 0,97).

Il est à noter également que l'extrait éthanolique a donné un pourcentage légèrement inférieur à celui de l'extrait aqueux du chloroforme et ceci devrait être dû à l'existence

d'un encombrement stérique qui aurait empêché la réduction du radical DPPH par l'extrait brut.

L'étude statique de ce test nous permet de voir que l'extrait organique du chloroforme est significativement inférieure en comparaison aux deux autres extraits qui ne présentent entre eux aucune différence significative.

➤ Détermination de l'IC₅₀ :

C'est un paramètre qui a été introduit récemment pour l'interprétation des résultats de la méthode DPPH, c'est la "concentration efficace" ou la valeur EC₅₀ (autrement appelée la valeur IC₅₀). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause une perte de 50% de l'activité DPPH (Molyneux ., 2004).

D'après les résultats de la Figure 26, qui présente l'activité scavenging du radical DPPH, de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles, nous constatons que l'activité anti radicalaire augmente en fonction de la concentration de l'extrait, donc il existe une proportionnalité entre l'activité anti-radicalaire et la concentration.

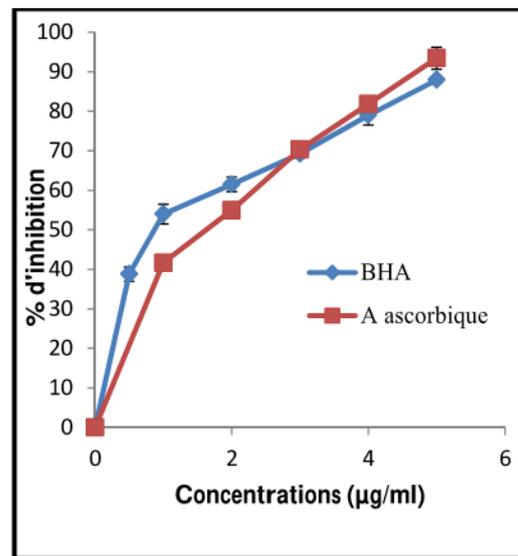
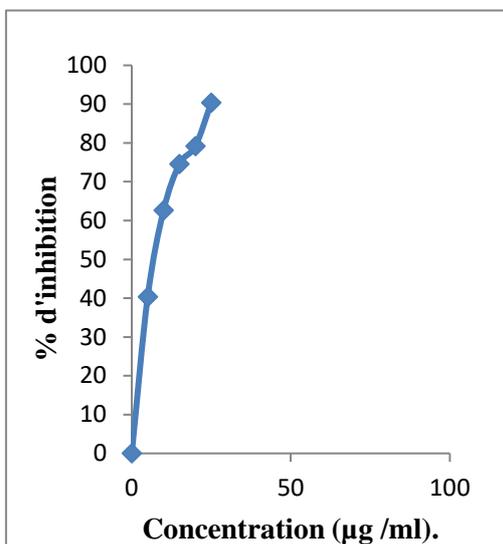


Figure n°26: Activité scavenging du radical DPPH. Figure n°26 : Activité scavenging de de l'acide ascorbique et la BHA.

Cette présentation permet de calculer l'IC₅₀ de l'extrait aqueux du chloroforme qui est égale à 7,025 µg/ml ; en comparant cette valeur aux IC₅₀ des standards (BHA : IC₅₀ = 0,98 µg/ml ; acide Ascorbique : IC₅₀ = 1,61 µg/ml) on trouve que l'IC₅₀ de l'échantillon est légèrement supérieure à celle des deux standards.

Rameshwar- Naidu *et al.*, (2012), ont trouvé une IC₅₀ égale à 25,2 µg/ml supérieure à l'IC₅₀ de notre extrait.

D'autre part, Fialová *et al.*, (2008) ont trouvé (18,1) IC₅₀ voisine à celle de notre extrait.

II-3-2)-Activité scavenging du radical ABTS^{•+} :

La génération du cation radical ABTS^{•+} constitue la base de l'une des méthodes spectrophotométriques qui a été appliquée pour la mesure de l'activité antioxydante totale des solutions de substances pures (Gülçin., 2007).

Les résultats du test de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS^{•+} du standard et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la Figure 27.

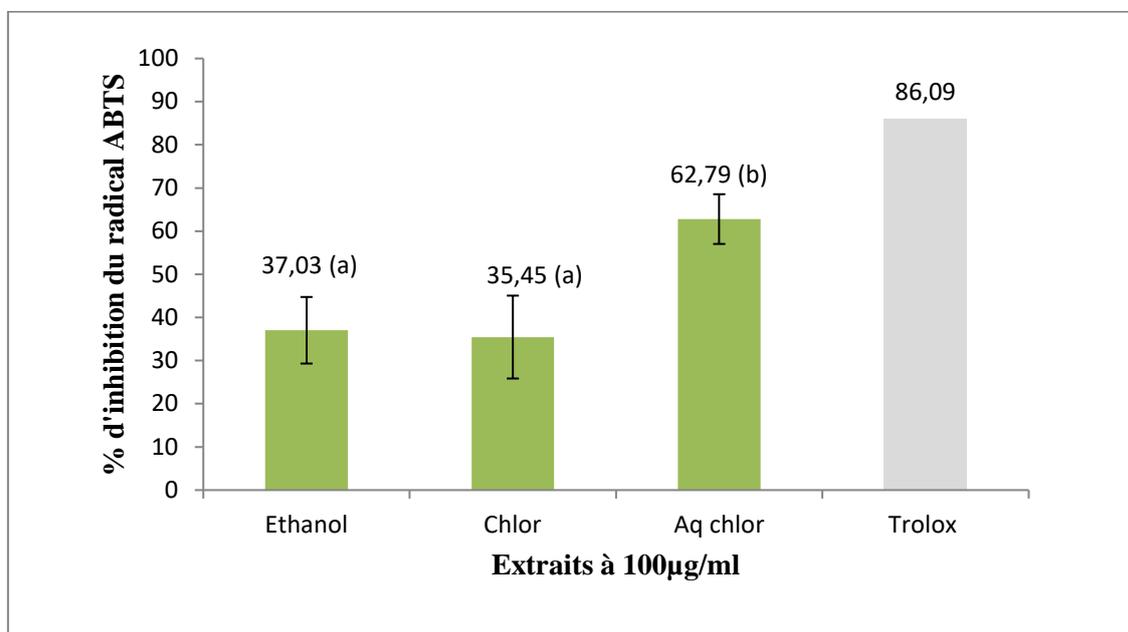


Figure n°27 : Activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} par les extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

à partir de cette figure nous constatons que les extraits de *Mentha spicata* ont tous montré une activité anti-radicalaire appréciable, et ils présentent des pourcentages d'inhibition allant de $35,45\% \pm 9,6$ à $62,79\% \pm 5,76$ comparativement au pourcentage donné par le standard Trolox qui a donné ($86,09\%$) à $100\ \mu\text{g/ml}$.

L'étude faite par **Arumugam et al .,(2010)** a donné $75,3\%$ comme pourcentage d'inhibition du radical ABTS par l'extrait aqueux des feuilles de *Mentha spicata* ce qui est très acceptable en comparaison aux résultats de notre étude.

Tout comme les résultats précédents, nous faisons remarquer que c'est également l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} le plus élevé vu sa richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins.

Brahmi et al., (2015), ont montré que les activités antioxydantes contre le radical (ABTS^{•+}) des fractions d'extraits de *Mentha spicata* sont étroitement liées à leur teneurs en phénols totaux.

En effet, il existe une bonne corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité inhibitrice du radical ABTS (Phénols totaux $R= 0,99$; flavonoïdes $R= 0,82$; tanins condensés $R= 0,99$).

Par ailleurs, l'étude statistique nous montre qu'il n'y pas de différence significative entre les deux extraits (brut et organique du chloroforme), par contre, l'extrait aqueux du chloroforme est significativement supérieur.

➤ 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* et celles du standard Trolox respectivement à $100\ \mu\text{g/ml}$.

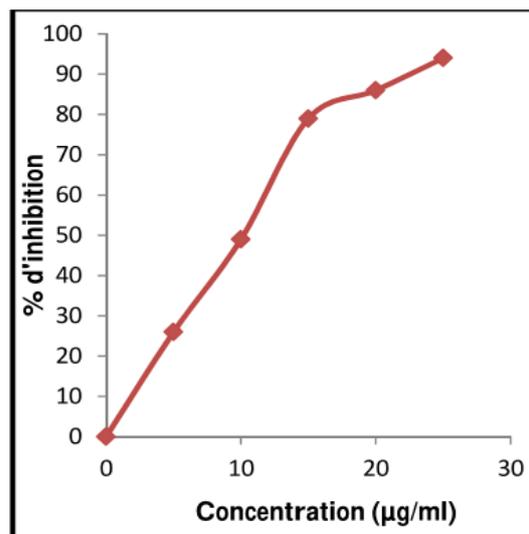
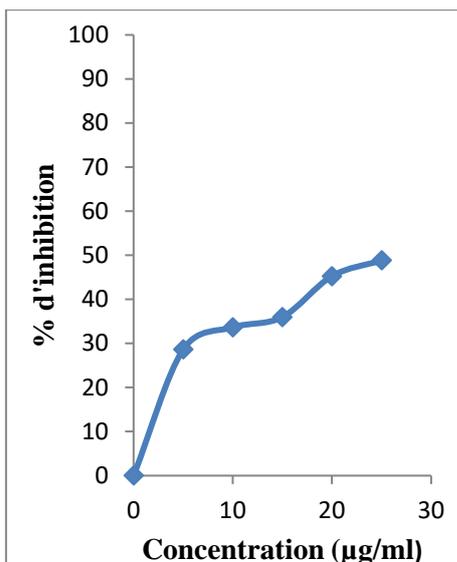


Figure n°28 : Activité scavenging du radical ABTS Figure n°28 : Activité scavenging de Trolox.

Il est a noté que l'IC50 du standard Trolox est égale à 9,72µg/ml, par contre l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme est de 28,98µg/ml ; d'après l'étude de **Kumar et al ., (2007)**, l'IC50 de l'extrait aqueux de *Mentha spicata* est 11,9µg/ml, cela est proche de l'IC50 de notre étude.

II-3-3)-Le pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur des extraits de *Mentha spicata* est représenté dans la figure 29 suivante :

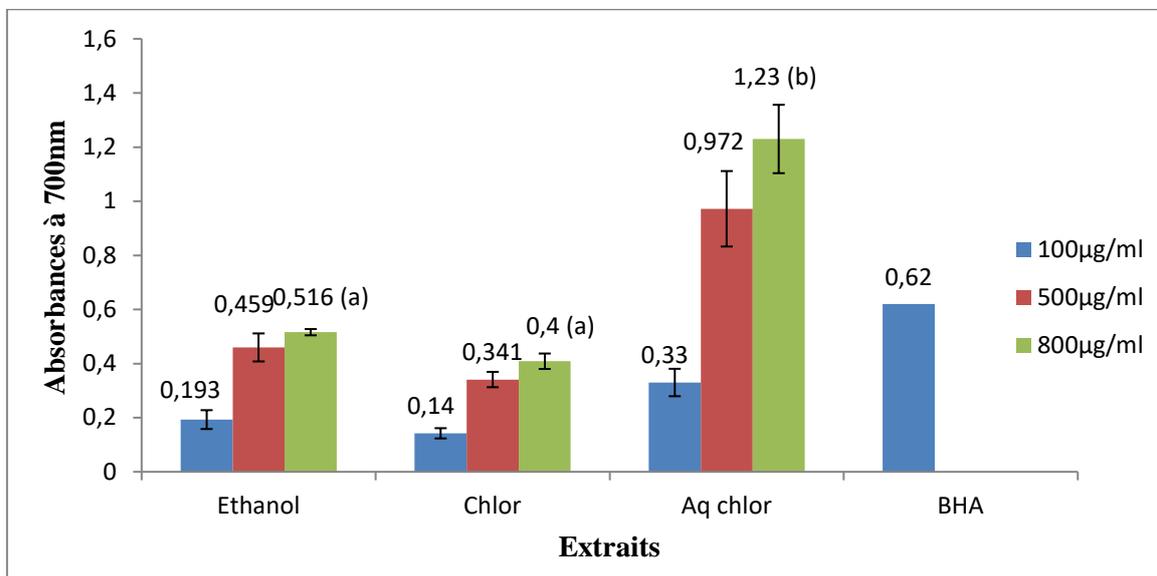


Figure n°29 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

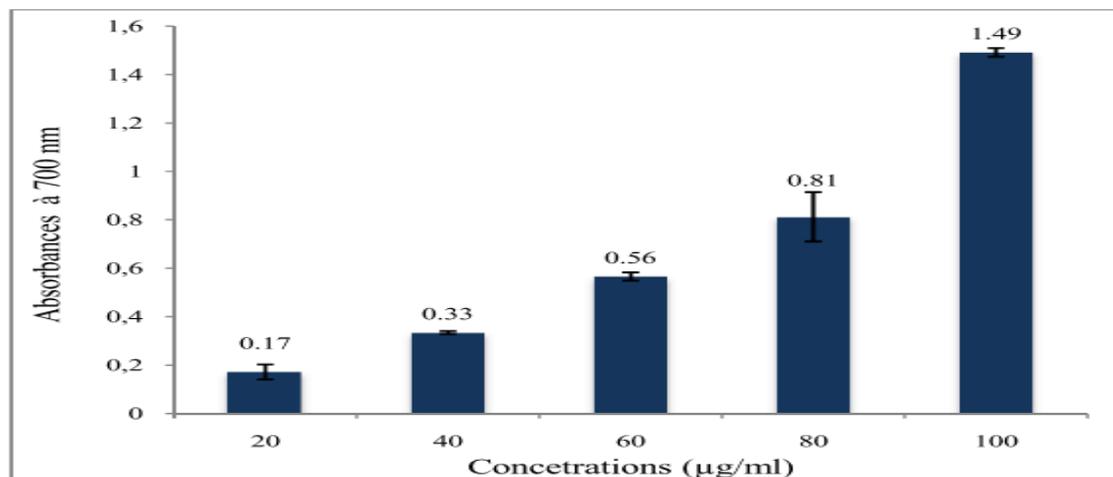


Figure n°30 : pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA.

Une vue d'ensemble de ces deux figures nous laisse constater que le pouvoir réducteur de nos extraits est élevé.

Une étude effectuée par **Soni et Sosa., (2013)** a présenté une absorbance de 1.75 pour l'extrait méthanolique des feuilles de *Mentha spicata* à 700 nm, ce résultat est très proche de celui de l'extrait aqueux du chloroforme de notre étude.

Les résultats de la (figure 29) montre que c'est l'extrait aqueux de chloroforme qui a donné l'absorbance la plus élevée que ça soit à la concentration de 100 de 500 ou de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

En effet, pour une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$, l'absorbance donnée par le standard est de 0,62, alors que les absorbances de nos échantillons varient de $(0,142 \pm 0,02)$ à $(1,23 \pm 0,05)$ et par là on peut déduire que nos extraits possèdent une capacité réductrice très importante.

Concernant le résultat de l'étude statistique pour ce test nous constatons qu'il n'y a aucune différence significative entre les extraits (éthanolique et organique du chloroforme), mais nous permet aussi de voir que l'extrait aqueux du chloroforme est significativement supérieur à ces deux derniers ($\alpha < 0,05$).

II-3-4)-La chélation du fer :

La chélation de Fe^{2+} par des extraits a été estimée par la méthode de **Dinis et al., (1994)**. La Ferrozine peut quantitativement former des complexes avec le Fe^{2+} . Cependant, en présence de chélateurs, la formation du complexe est perturbée par le résultat que la couleur rouge du complexe est diminuée. La mesure de la réduction de la couleur permet donc l'estimation de l'activité chélatante du coexistant chélateur (**Ebrahimzadeh et al, 2008**).

Les résultats obtenus par le test du chélation du fer des extraits de *Mentha spicata* et du standard EDTA sont présentés dans la Figure 26 :

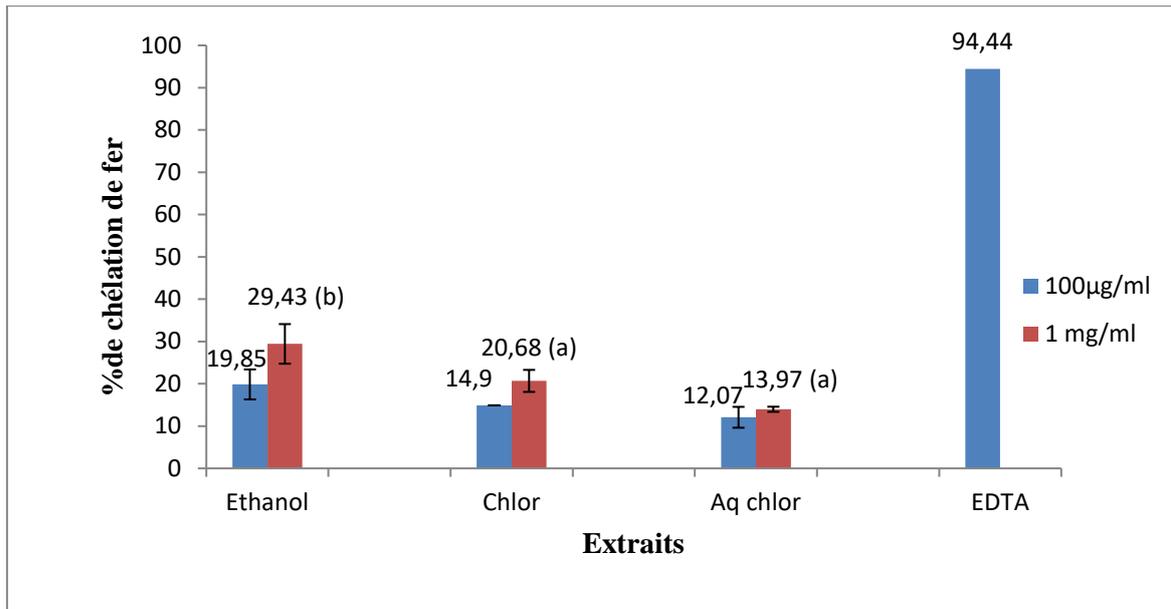


Figure n°31 : Représentation graphique du pouvoir chélateur du fer des extraits des feuilles de *Mentha spicata*.

Les résultats de la figure 31 nous montrent que l'activité chélatrice de notre plante est faible par rapport au standard EDTA qui a donné 94,44% du pouvoir chélateur du fer.

Serteser *et al.*, (2009), ont effectué une étude dans laquelle ils ont trouvé 39.64 % du pouvoir chélateur de l'extrait méthanolique des feuilles de *Mentha spicata* ce qui est au voisinage du pourcentage donné par l'extrait éthanolique de notre étude.

Cependant, il est à noter que c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné une activité chélatrice du fer la plus élevée par rapport à l'extrait aqueux du chloroforme ; cela s'expliquerait par le fait que les extraits organique serait riches en huiles essentielles se solubilisant dans des solvants apolaires (Adam *et al.*, 1998).

Par ailleurs, nous constatons d'après l'étude statistique de nos résultats que les deux extraits aqueux et organique du chloroforme ne présentent aucune différence, contrairement à l'extrait brut qui est significativement supérieur à ces deux derniers ($\alpha < 0,05$).

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion et perspectives :

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles de l'espèce *Mentha spicata* ce qui nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

L'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Mentha spicata*. A indiqué que ce sont les extraits organiques du chloroforme qui ont exhibé les taux d'extraction les plus élevés, ce qui nous permet de constater que notre plante est riche en composés de polarité réduite.

- Les teneurs en phénols totaux des extraits de notre plante ont été très élevées et l'extrait aqueux est celui qui a donné la teneur la plus importante.
- D'autre part les extraits des feuilles de *Mentha spicata* ont présenté des teneurs très appréciables en flavonoïdes.
- Concernant les tanins, les extraits de *Mentha spicata* ont dévoilé des taux modérés.
- Quant à l'activité antioxydante, nous constatons que les extraits de notre plante ont présenté une activité scavenging du radical DPPH très élevée. De plus, nous constatons que c'est l'extrait aqueux qui a été le plus fort par rapport à l'extrait organique.
- D'autre part, nous constatons que nos extraits ont dévoilé une activité anti-radicalaire ABTS très élevée.
- Néanmoins, nos extraits ont aussi exhibé une capacité réductrice très importante.
- Par ailleurs, le test de chélation de fer nous a montré un % de chélation élevé par rapport aux deux autres extraits.

En fin, l'activité antioxydante peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydantes testées et les composés phénoliques suggérant que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes de *Mentha spicata*. Ainsi, il est souhaitable

d'isoler, purifier et identifier les constituants biochimiques responsables de ces différentes activités par d'autres méthodes plus performantes et plus précises.

Par ailleurs, il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests antioxydants in vivo afin d'étudier l'efficacité et la toxicité des extraits ; aussi bien que de s'investir dans d'autres parties de la plante, à savoir, la tige, les fleurs, les racines.

Liste des références

Liste des références :

A

- Abdou Bouba A., Njintang Y.N., Scher J. et 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.
- Abidjan C.L. (2010). 11^{ème} Symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales –Grasse .*Springer-Verlag France* ,8 :55-62.
- Abootalebian M., Kermit J., Kadivar M., Ahmadi F. et Abdinian M. (2016). Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M.longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Science*, 61:176-181.
- Achat S. (2013). Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques .Thèse de doctorat en CO-TUTELLE présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, filière Biologie, Université A. MIRA-Béjaia et Ecole Doctorale 536-Avignon, p.22-25.
- Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T. et Arsenakis M. (1998). Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* Essential oils against Human pathogenic fungi. *J.Agric.Food Chen*, 46 :17- 41.
- Afonso v.O., Champy R ., Mitrovic D ., Collin P .et Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales .*Revue du Rhumatisme*, 74 :637-642.
- Annaházi A., Mracskó E., Süle Z., Karg E., Penke B., Bari F. et Farkas E. (2007). Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European Journal of Pharmacology*, 571 : 120–128.

- Ahmad N., Fazal H., Ahmad I. et Haider-Abbasi B. (2012). Free radical scavenging (DPPH) potential in mine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial health*, 28(1):87-90.
- Arumugam P., Priya N. G., Subathra M. et Ramesh A. (2008). Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environ .Toxicol.Pharm*, 26(1): 92-95.
- Arumugam P., Ramamurthy P. et Ramesh A.(2010). Antioxidant and cytotoxic Activities of Lipophilic and Hydrophilic Fraction of *Mentha spicata* L.(Lamiaceae). *International Journal of Food Properties*, 13(1):26-33.



- Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement . *Médecine /Sciences*, 22: 266-272.
- Barchan A., Bakkali M., Arakrak A .et Laglaoui A. (2016). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie*, 14:89-76.
- Benabdallah A. (2016). Etude écophysiological, développement et importance des plantes médicinales du genre *Mentha* dans le parc national d'El-Kala (Nord -Est- Algérie). Thèse de doctorat en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences, filière Biologie Végétale, p.41-54.
- Benabdallah A., Rahmoune C., Boumendjel M., Aissi O. et Messaoud C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9):762-780.

- Ben- Saad A.,Rjeibi I. Alimi H.,Ncib S.,Bouhamada T.et Zouari N.(2017).Protective effects of *Mentha spicata* against nicotine-induced Toxicity in liver and erythrocytes of wistar rats.*Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*,23:210-219.
- Berger M. (2006).Manipulation nutritionnelle du stress oxydant : état des connaissances .*Nutrition Clinique et Métabolisme* ,20 :50-57.
- Boizot N.et 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*, 23 :79-84.
- Bonnefont-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J.L., Thérond P., Legrand A. et Delattre J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxydative stress, vasculaire fonction and athéroscléroses. *Nutrition clinique et métabolisme* ,16 :163-177.
- Boubekri C. (2014). *Etude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de Solanée melongena par des techniques électrochimiques*. Thèse présentée en vue de l'obtention Du diplôme de Doctorat en sciences, Spécialité Chimie, Université Mohamed Khider – Biskra, p .25-57.
- Bourgeois L. (2009). *Remèdes et recettes de grand-mère*. Paris : Édition Rustica.1p.
- Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K,Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stévigny C., ChibaneM .et 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*).*Hal archive ouvertes*, 15-18.

C

- Chakravarty H.L. (1976) .*Plant wealth of IRAQ*. India: Edition SREE SARASWATY PREESS.359P.
- Chiang H.C., Lo Y.J. et Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophilaspinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61-71.
- Chira K., Suh J.H., Saucier C. et Teissédre P.L. (2008).Les polyphénols du raisin .*Phytothérapie* ,6 :76-84.
- Cillard J. et Cillard P. (2006).Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations .*OCL*, 13 :24-27.

D

- Defraigne J.O. et Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège* ,63 :12-21.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic Derivates (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of Membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 161-169.

E

- Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F.et Bekhradnia A.R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18) :3190-3200.

F

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

- Fialová S., Tekeľová D., Mrlianová M. et Grančai D. (2008). The determination of phenolics compounds and antioxidant activity of MINTS and balms cultivated in Slovakia. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae Tomus LV*, 55:99-110.
- Fletcher R.S., Mc-Auley C. et Katt L.S. (2005). Novel *Mentha spicata* chanes with Enhanced Rosmarinic Acid and Antioxidant Activity. *Traditional Medicine et Nutraceuticals*, 6:32-33.



- Ghazghazi H., Aouadhi C., Maaroufi A. et Hasnaoui B. (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydant des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol.Hyg.Alim*, 25(73) :38-46.
- Gülçin I. (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities Of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32 :436-501.



- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. et Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62(10):632-641.
- Hemalatha S., Lalitha P. et Arulpriya P. (2010). Antioxidant activities of the extracts The aerial roots of *Pothosaurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6):84-89.
- Hosseinimehr S.J., Pourmorad F., Shahabimajd N., Shahrbandy K. et Hosseinzadeh R. (2007). In vitro Antioxidant Activity of *Polygonium hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(4):638-639.

J

- Ismaili R., Lamiri A. et Moustaid K. (2016). Study of anti-eczema activity of essentials oils of *thymus vulgaris*, *Citrus limonum* and *Mentha spicata* from Morocco. *International journal of innovation and applied studies*, 14 (1):113-120.

J

- Javan A.J. (2013).Evaluation of antioxydant capacity of the Ethanol extract of Iranian *Mentha spicata*. *Journal of Open Access Scientific Reports*, 2:706-715.

K

- Kanatt S.R., Chande R.et Sharma A. (2007).Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata.L*) in radiation –processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100:454-456.
- Kee L.A., Shori A.B. et Baba A.S. (2017).Bioactivity and health effects of *Mentha spicata*. *Integrative food, Nutrition and Metabolism*, 5(1):1-5.
- Khadhri A., EL moknir R. et Smiti S. (2013). Composes Phénoliques et Activités Antioxydantes De Deux Extraits De Chardon a Glu. *Atractylis gummifera*, 39:47-53.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006).Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique ET metabolism*, 20: 165–170.

- Kumar, A. et Chattopadhyay S. (2007). DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chem*, 100: 1377–1384.

J

- Lacolley P. (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. *Edition John Libbey Eurotext*, p 312.
- Laguerre M., Lopez-Giraldo L J., Lecomte J., Pina M .et Villeneuve P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité anti-oxydante. *OCL*, 14(5) :281-284.
- Le K., Chiu F. et Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.

M

- Migdal C. et Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences*, 27 :409-417.
- Montain B. (2002). Traité d'aromathérapie buccodentaire. *Edition Guy Trédaniel* : 168-175.
- Menvielle-Bourg F. J. (2005). Le superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 118 – 121.
- Moldovan R.I., Oprean R., Benedec D., Hanganu D., Duma M., Oniga I. et Vlase C. (2014). LC-MS Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(2) :565-570.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technos*, 26(2):215-225.



- Nadal B. (2009). *Synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les Rayonnements ionisants*, Thèse de doctorat Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences, Spécialité Chimie Organique, Université Paris SUD XI, p.134-148.



- Ogunlana O. E. et Ogunlana O. O. (2008). In vitro assessment of antioxidant activity Of *Newbouldialaavis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (8): 176-179.
- Olivereau F. et Robouam N. (2014). Guide des Plantes des milieux humides .*Editions Belin : (164-165)*.
- Oyedemi S. et Afolayan A.j. (2011). In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueouss Leaves Extract of *Leonotis (L.)R.Br.**International Journal of Pharmacology*, 7(2): 248-256.



- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidant. *Journal of Natural Products*, 63 (7) :1035-1042.
- Pincemail J., Le Goff C., Charlier C., Gillion P., Cheramy-Bien J.P., Van Honacker E., Chapelle J.P.et Defraigne J.O. (2009). Evaluation biologique du stress oxydant Application en routine clinique. *Nutritions & Endocrinologie* ,23-28.

R

- Rameshwar-Naidu J., Ismail R.B., Yeng C., Sasi-Dharan S. et Kumar P. (2012). Chemical composition and antioxidant Activity of crude methanolic extrats of *Mentha spicata*. *Journal of Phytology*, 4(1):15-19.
- Roginsky V .et Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* ,92 :236-240.

S

- Serteser A., Kargiöglu M., Gök V., Bağcı Y., Musa-özcan M. et Arslan D. (2009). Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *GRASAS Y ACEIRES*, 60(2):149-151.
- Soni A. et Sosa S. (2013). Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4) :27-35.
- Sytar O., Hemmerich I., Zivcak M., Rauh C. et Brestic M. (2016). Comparative analysis of bioactive phenolic Compounds Composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25-34.

T

- Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles* : Edition Tec et Doc, Lavoisier. P310-318.
- Tsumbu C.N., DEBY-Dupont G., Tits M., Angenot L., Frederich M., Kohnen S., Moutithys-Mickalad A., Sertheyn D. et Franck T. (2012). Polyphenol Content and Modulatory Activities of Some Tropical dietary Plant Extracts on the Oxidant

Activities of Neutrophils and Myeloperoxidase. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:2-32.



- Vattem D.A., Ghaedian R.et Shetty A. (2005). Enchancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr*, 14(2):121-126.



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



- Zazzo J .F. (2002).Stress oxydant au cours des états inflammatoires aigus et des états D'agression: implications pour la pratique clinique. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 :269-274.

Annexes

Annexe I

Appareillage et réactifs

- **Matériel**

- ✓ Etuve
- ✓ Bain Marie
- ✓ Balance de précision
- ✓ pH-mètre
- ✓ Plaque agitatrice
- ✓ Spectrophotomètre
- ✓ Pipette de 02ml
- ✓ Béchers
- ✓ Cristallisoirs
- ✓ Creusés
- ✓ Boîtes pétries
- ✓ Eprouvettes
- ✓ Tubes en verre avec bouchons
- ✓ Portoirs
- ✓ Tubes à essai
- ✓ Micropipette de 1000µl

- **Réactifs**

- ✓ Ferrozine.
- ✓ FeCl₂.
- ✓ persulfate de potassium.
- ✓ persulfate de potassium.
- ✓ ABTS.
- ✓ Méthanol.
- ✓ DPPH.
- ✓ Vanilline.
- ✓ acétate de sodium.
- ✓ AlCl₃.
- ✓ carbonate de sodium.
- ✓ Folin-Ciocalteu.
- ✓ NaH₂PO₄.
- ✓ NaH₂PO₄.
- ✓ Na₂HPO₄.
- ✓ Na₂HPO₄.
- ✓ Ferricyanure de potassium.
- ✓ TCA.
- ✓ FeCl₃.

Annexe II

Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

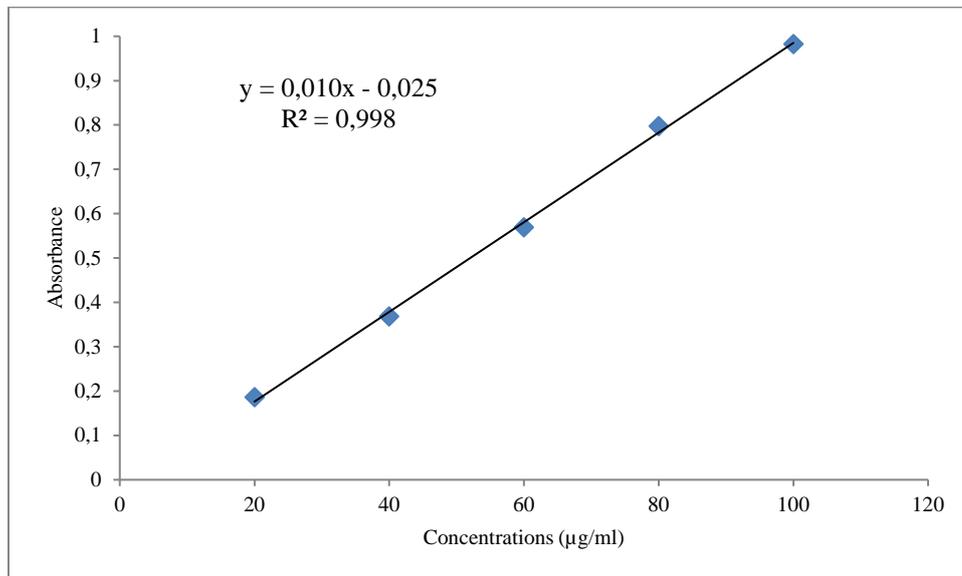


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765\text{nm}$).

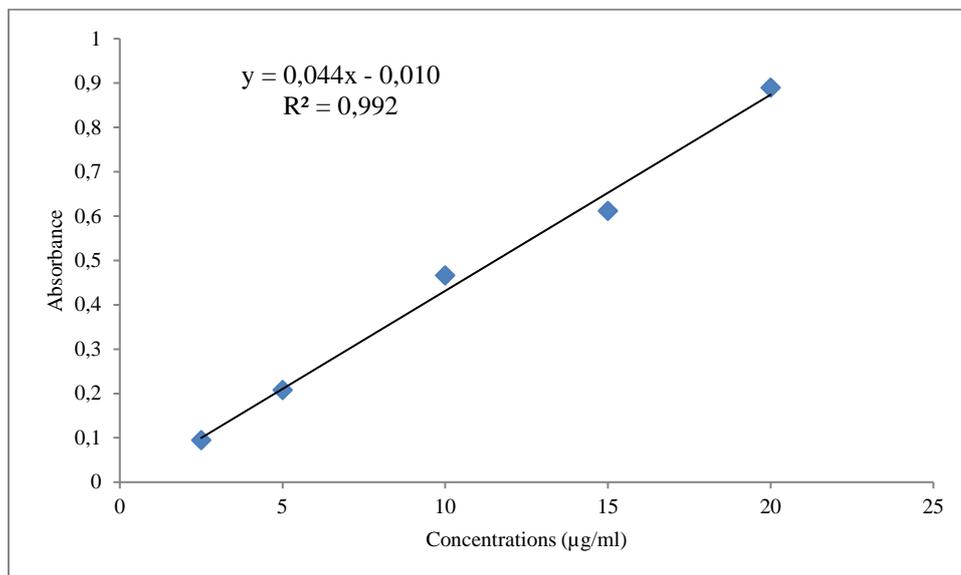


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430\text{ nm}$).

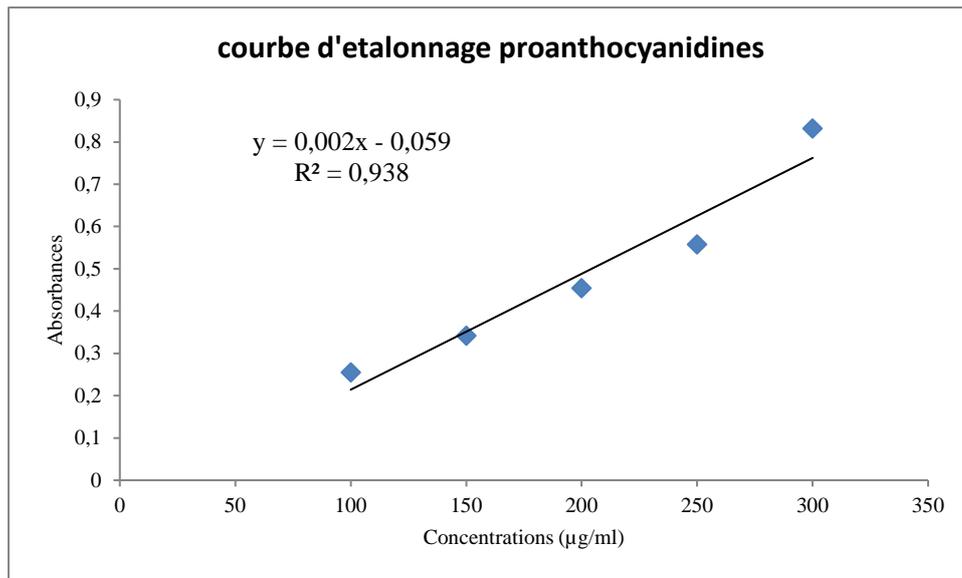


Figure 03 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le proanthocyanidines

($\lambda = 500$ nm).

Annexe III

Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical DPPH

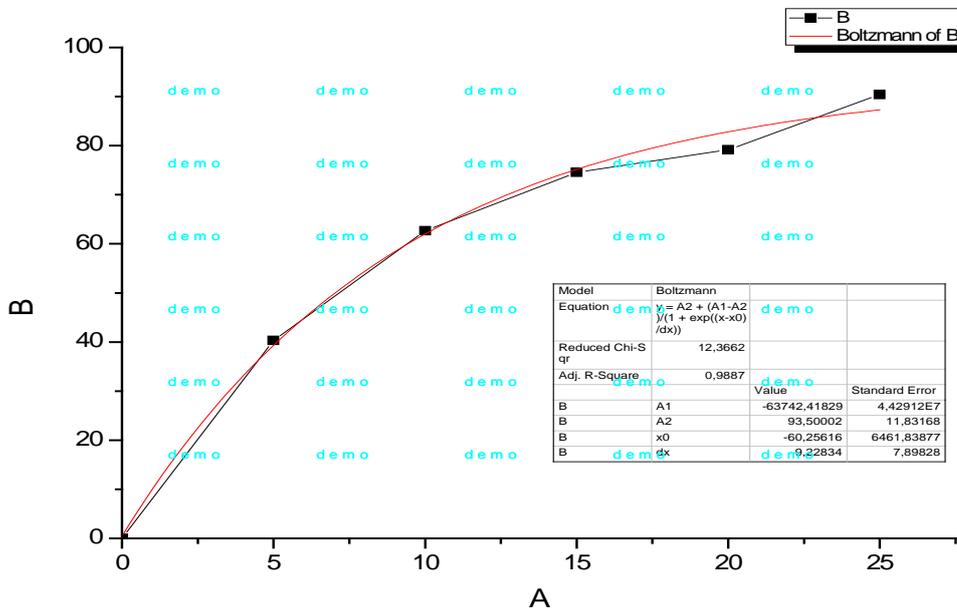


Figure 04: courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme feuilles.

Annexe IV

Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical ABTS pour les feuilles

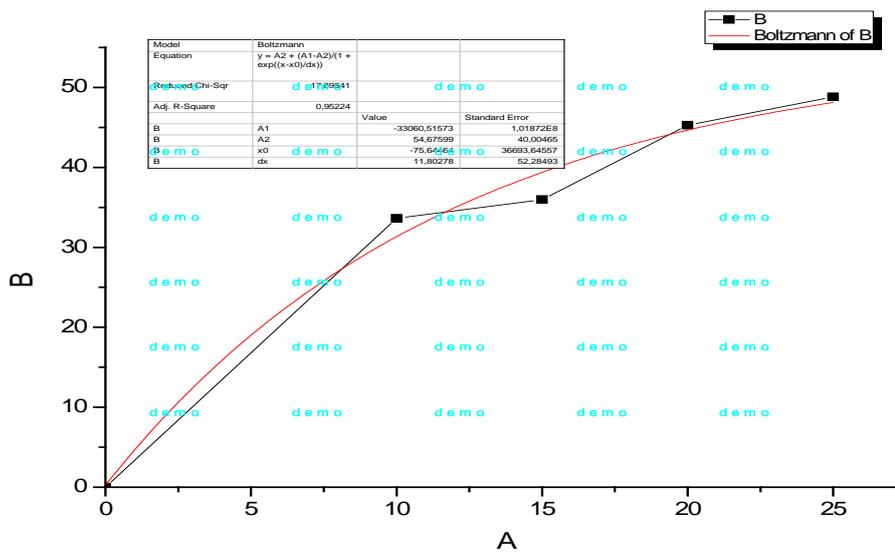


Figure 5: courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme feuilles.

Annexe V

Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proantocyanidine des extraits.

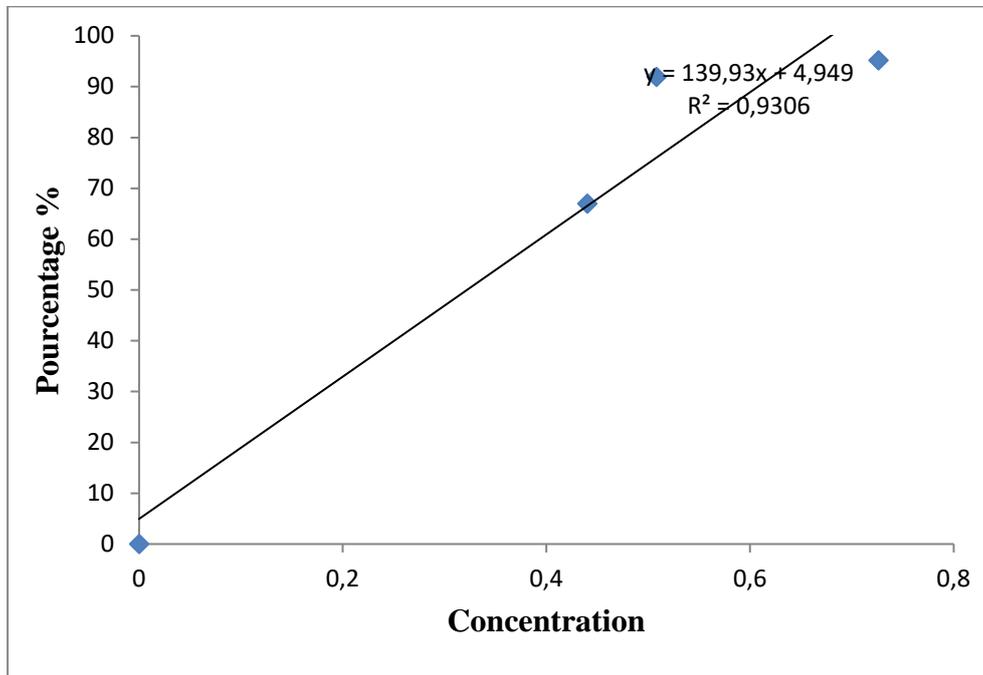


Figure 6 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux.

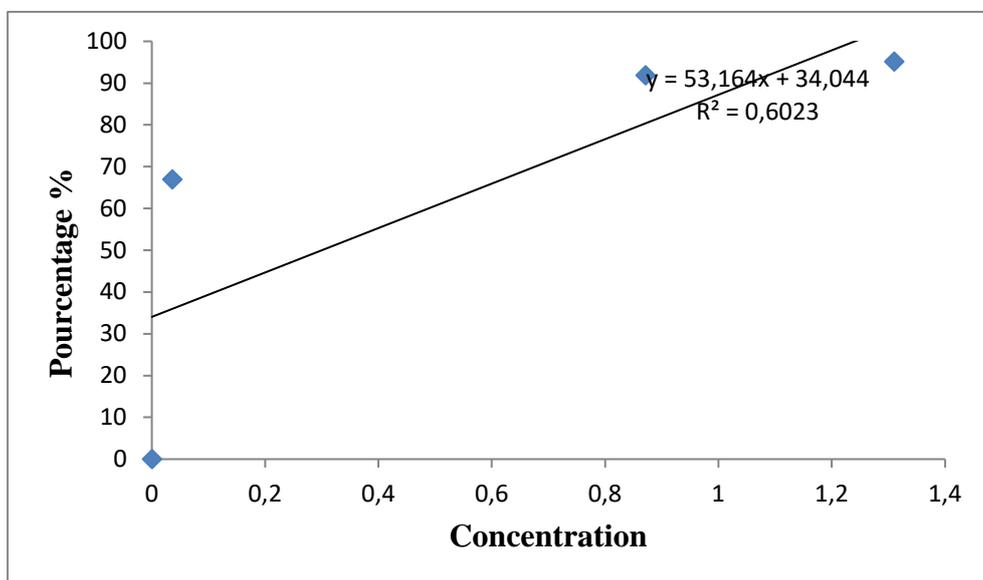


Figure 7 : courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en flavonoïdes .

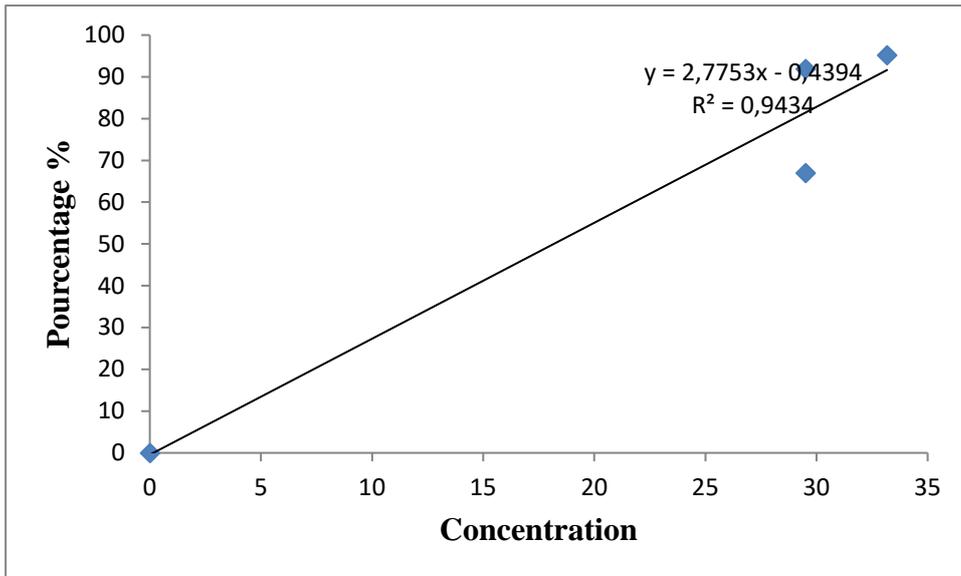


Figure 8 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines

Annexe VI

Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proantocyanidine des extraits

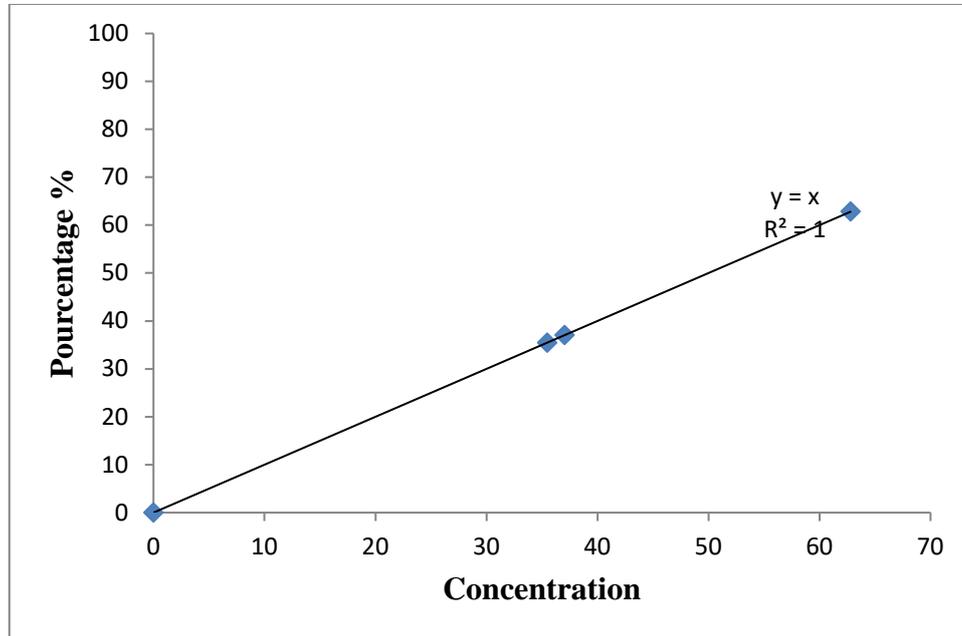


Figure 9 : courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en phénol totaux.

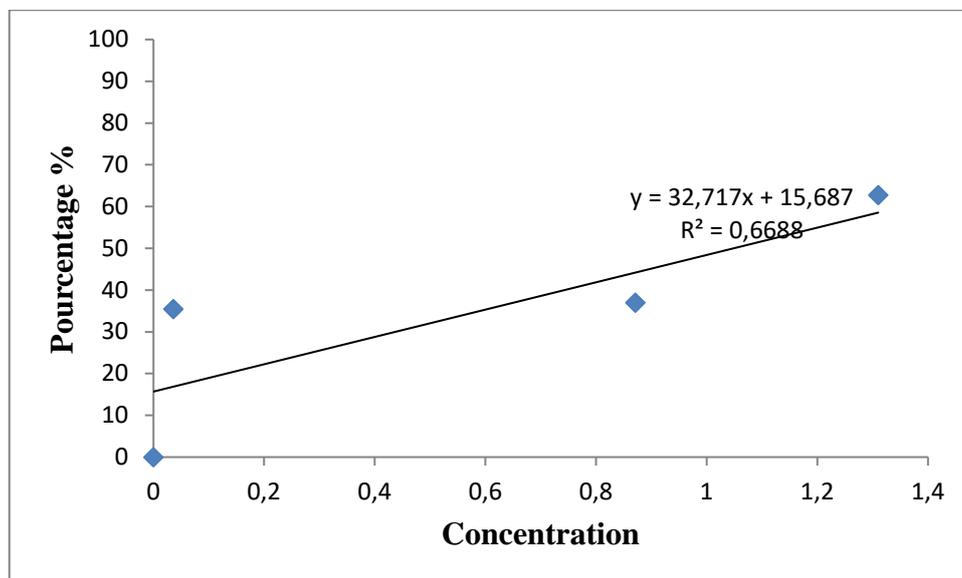


Figure 10 : courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en flavonoïdes.

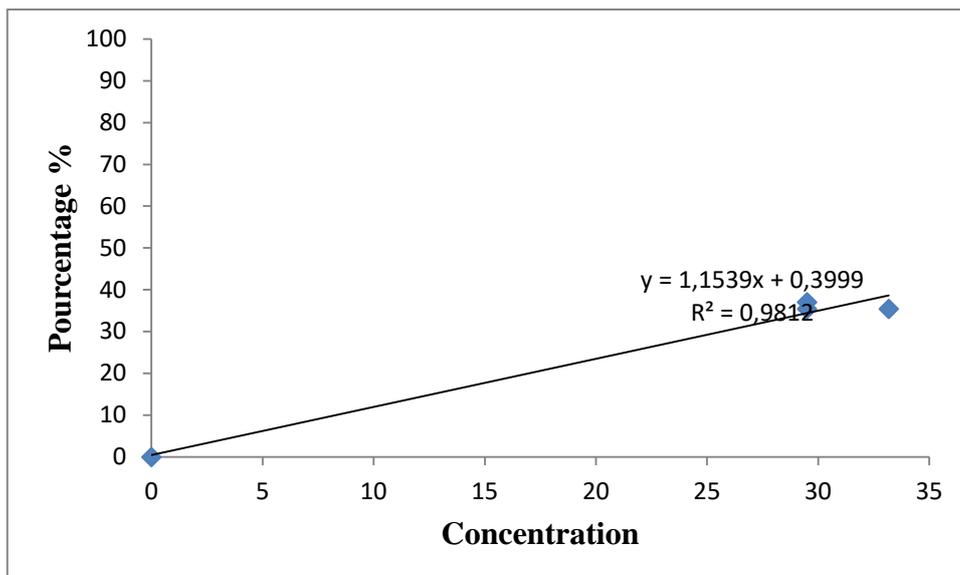


Figure 11: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en proanthocyanidines.

Annexe VII

Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidine des extraits.

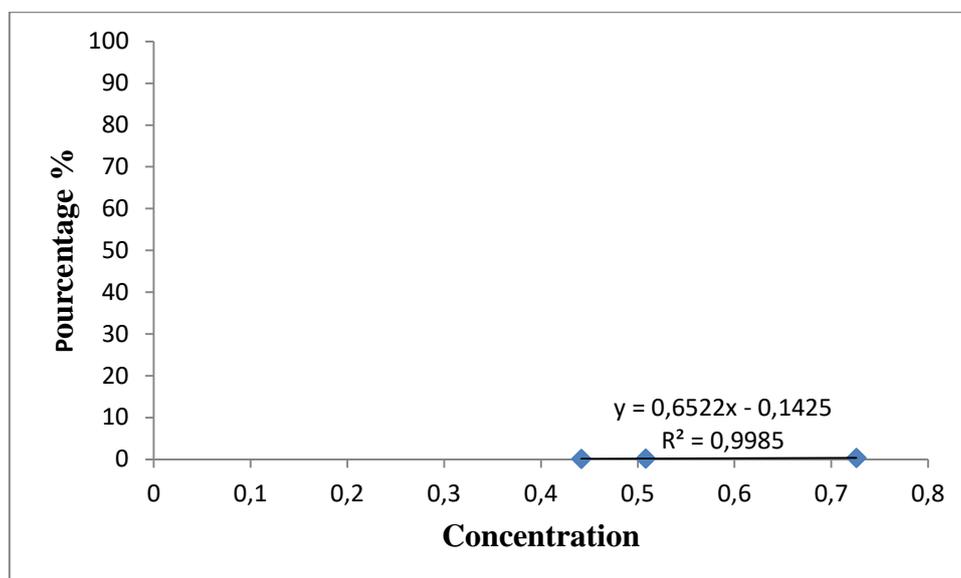


Figure 12 : courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénol totaux.

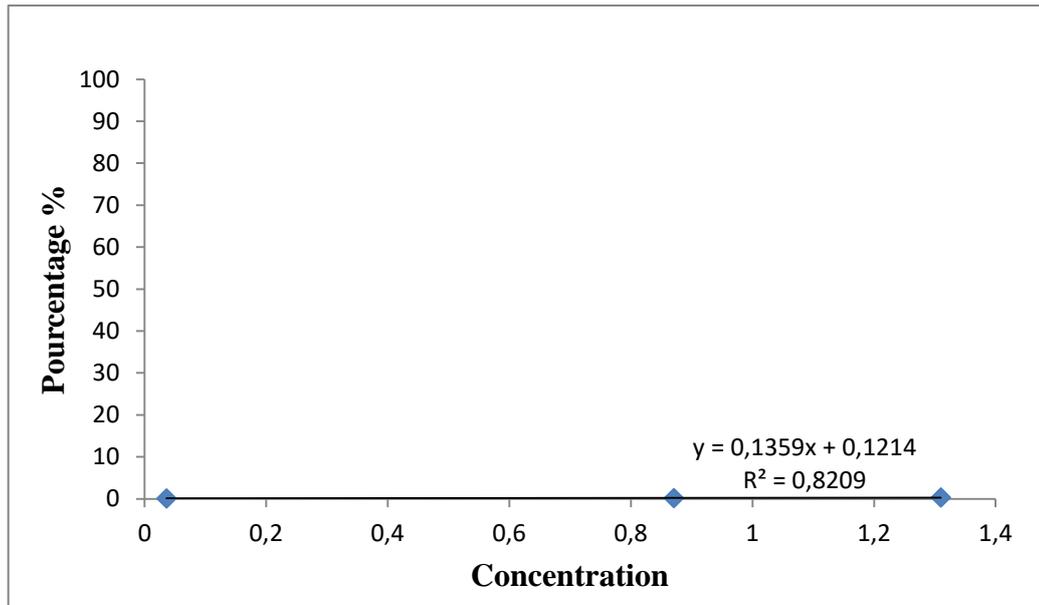


Figure 13 : courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes.

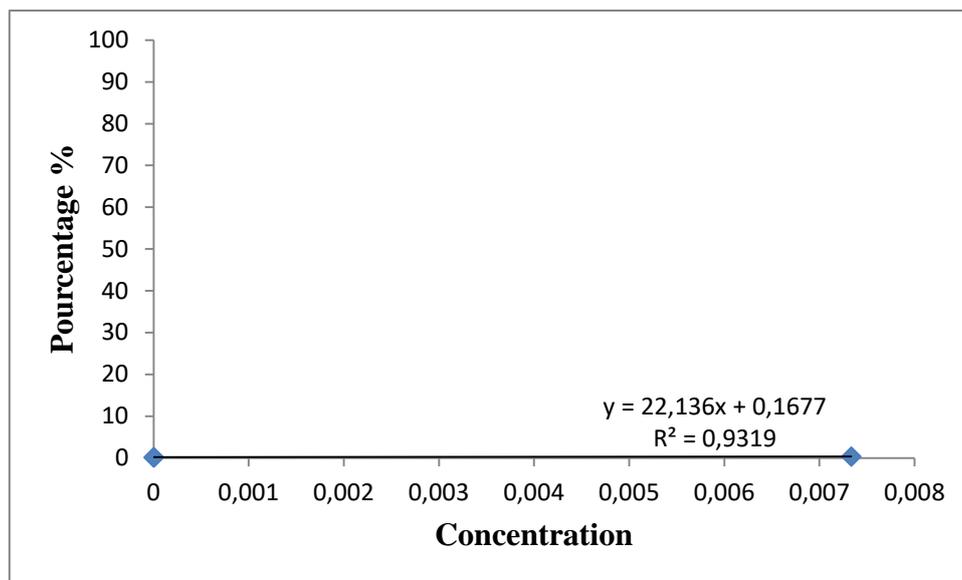


Figure 14 : courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en proanthocyanidines.

Annexe VII

Courbe de corrélation entre l'activité chélatrice du fer et les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en proantocyanidine des extraits.

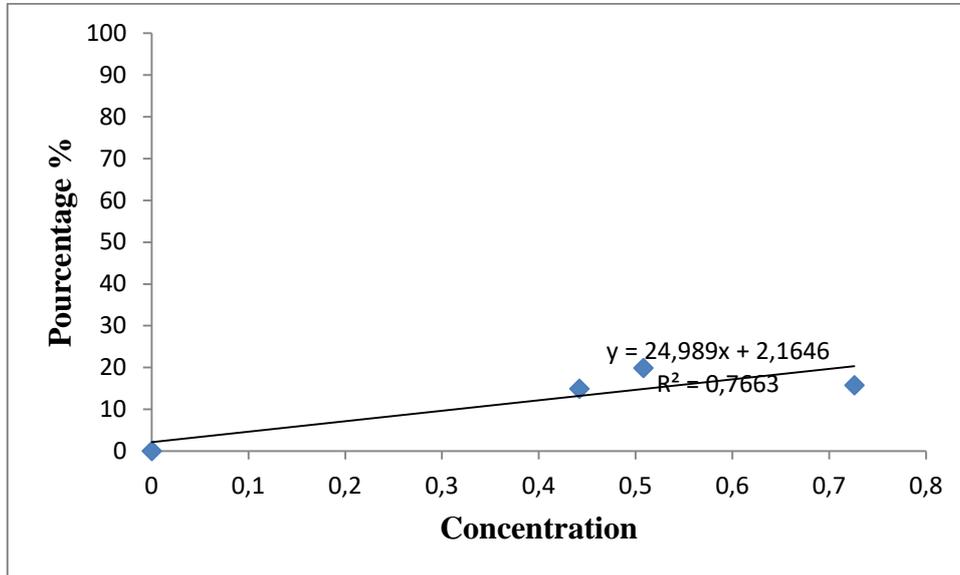


Figure 15 : courbe de corrélation entre la chélation de fer et la teneur en phénol totaux.

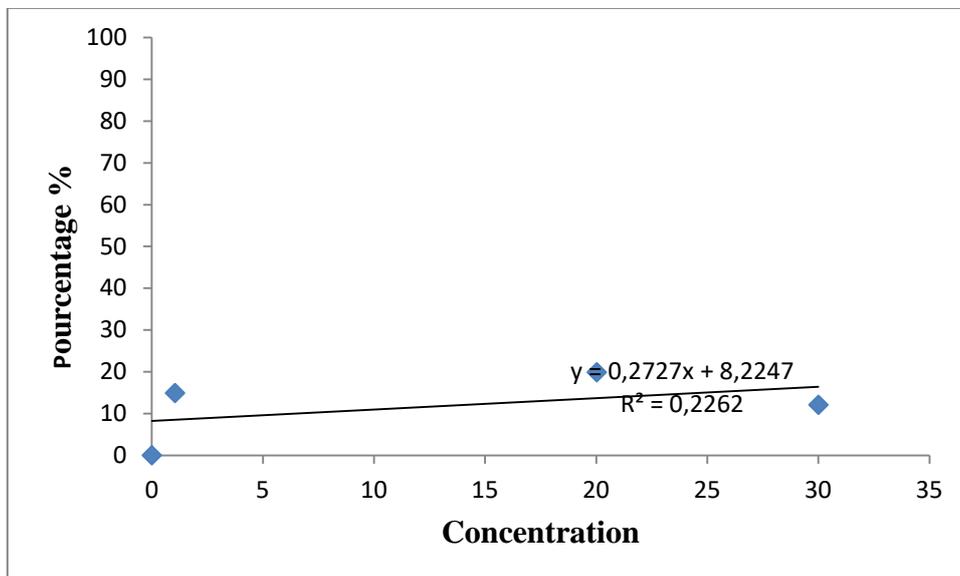


Figure 16 : courbe de corrélation entre la chélation de fer et les teneurs en Flavonoïdes.

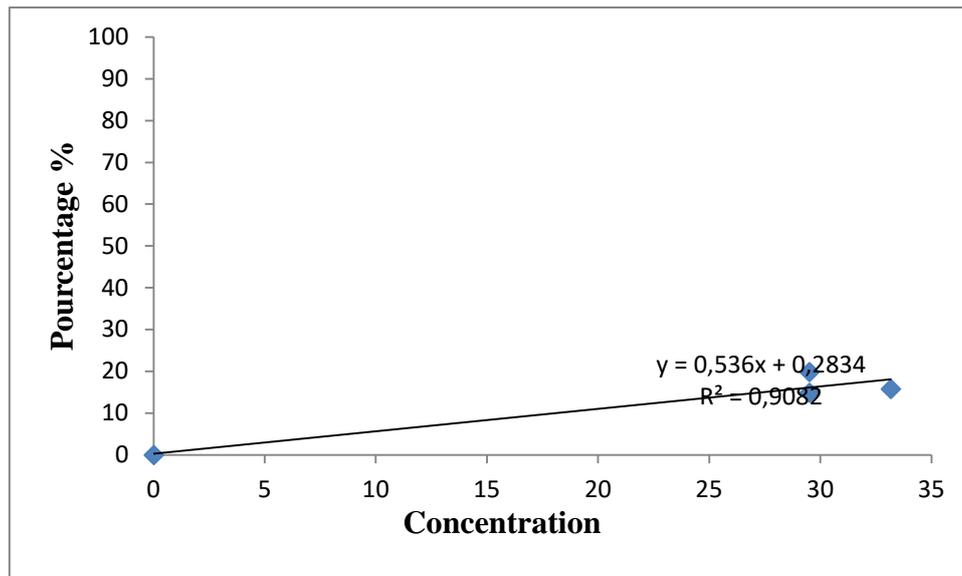


Figure 17 : courbe de corrélation entre la chélation de fer et la teneur en proanthocyanidines.

Résumé

Le travail entrepris avait pour objectif, l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles d'une plante aromatique et médicinale locale qui est *Mentha spicata* et cela en faisant deux types de manipulations. D'abord on le dosage des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative de trois extraits des feuilles de cette plante, ensuite la mesure de leur capacité anti-oxydantes tout en mettant en œuvre quatre tests physico-chimiques différents : test de l'activité scavenging des deux radicaux DPPH• et ABTS•⁺, le pouvoir réducteur ainsi que la chélation de fer. Les résultats des analyses effectuées ont révélés que les extraits de *Mentha spicata* ont été riches en phénols totaux et ont montré des concentrations moyennes en flavonoïdes et des teneurs appréciables en tanins condensés. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH•. En revanche, l'activité inhibitrice du radical ABTS•⁺ et la chélation du fer ont été faibles. Par contre l'activité réductrice de ces extraits était très importante. Enfin l'ensemble de ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes aromatiques et médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mots clés : *Mentha spicata*, composés phénoliques, activité anti-oxydante.

Summary

The objective of the work undertaken was to evaluate the antioxidant activity of the leaf extracts of a local aromatic and medicinal herb that is *Mentha spicata* by doing two types of manipulations. First, an assay of the phenolic compounds (total phenols, flavonoids, and condensed tannins) was made to make a qualitative and quantitative assessment of three extracts of the leaves of this plant, then their antioxidant capacity was measured while putting implemented four different physico-chemical tests: test of the scavenging activity of the two radicals DPPH and ABTS, the reducing power as well as the iron chelation. The results of the analyzes revealed that the extracts of *Mentha spicata* were rich in total phenols and showed average flavonoid concentrations and appreciable contents of condensed tannins. As for the antioxidant activities of the plant, the extracts were very good scavengers of the radical DPPH. On the other hand, the inhibitory activity of the radical ABTS and the chelation of iron were weak. On the other hand, the reductive activity of these extracts was very important. Finally, all these findings allow us to imagine further studies on extracts of a range of aromatic and medicinal plants in order to benefit from them.

Key words: *Mentha spicata*, phenolic compounds, antioxidant activity, Free radicals.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات أوراق عشبة طبية و عطرية و محلية هي *Mentha spicata*

أولا تم إجراء تحليل كمي ونوعي للمركبات الفينولية ثم تم قياس القدرة المضادة للأكسدة و ذلك بتنفيذ أربع اختبارات فيزيوكيميائية مختلفة واختبار نشاط الكبح للجذرين DPPH, ABTS مع قوة تخفيض و استخلاص الحديد. و أظهرت نتائج التحليل أن *Mentha spicata* كانت غنية بالفينول الكلي. اما بالنسبة للأنشطة المضادة للأكسدة في النبات فقد كان النشاط المثبط للجذرين DPPH, ABTS جيدة جدا و كان النشاط الاختزالي مهما جدا اما الاستخلاص الحديد فقد كان ضعيفا. وأخيرا كل هذه النتائج تسمح لنا بتخيل المزيد من الدراسات حول مستخلصات من نباتات عطرية طبية مختلفة من اجل الاستفادة منها.

الكلمات المفتاح

Mentha spicata, DPPH, ABTS, المضادة للأكسدة, المركبات الفينولية

