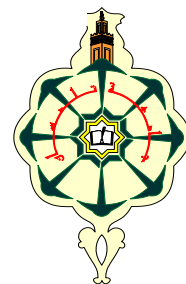


République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme

Master en Sciences biologiques

Option : Biochimie

Thème

Etude phytochimique et recherche et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés de la menthe verte (*Mentha spicata* L.).

Présenté Par: M^{elle} **BRIXI GORMAT Radia**

Soutenu le : **21/06/2020** Devant le jury composé de :

M^r **AZZI Rachid**

M.C.A

Président

M^{elle} **MEZOUAR Dounia**

M.C.B

Examinatrice

M^r **LAHFA Boucif Farid**

Pr.

Promoteur

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements

D'abords je remercie dieu, le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon promoteur **M^r LAHFA Boucif Farid**, *Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, pour avoir accepté de m'encadrer et diriger ce modeste travail, pour sa gentillesse, sa bienveillance et son soutien. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous sa direction.*

J'exprime mes sincères remerciements à M^r AZZI Rachid maîtres des conférences classe «A» au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury ainsi que pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa sympathie.

Mes vifs remerciements à **M^{elle} MEZOUAR Dounia** *maîtres des conférences classe «B» au département de biologie, université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- de me fait l'honneur d'examiner ce travail.*

J'exprime également mes remerciements les plus sincères et mes respects à **M^{me} MAHDI Souad** et **M^{elle} ABBOU Fayza** doctorantes en biologie, pour leur soutien, leur gentillesse, leurs conseils, leurs remarques et surtout leur disponibilité.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Ma chère maman et mon cher papa pour leur amour, leur tendresse et leur soutien ... vous étiez toujours là pour moi...Je vous aime énormément

Ma chère, ma confidente et ma fierté sœur douaa

Mon fiancé amine pour sa compréhension et son aide tout au long de ce travail

Ma belle famille

Mes chères amies

Toute la famille Bixi

Je vous souhaite une longue et heureuse vie

ملخص

تركز الكثير من الأبحاث على استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية للوقاية والعلاج من الأمراض المختلفة. في هذا السياق نتطرق إلى دراسة كيمو نباتية وبحث وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لعدة مستخلصات من سيقان وأوراق النعناع. عائلة الشفويات التي تم جمعها من منطقة الحناية بولاية تلمسان.

يبدأ هذا العمل بدراسة كيمو نباتية تليها معايرة المركبات الفينولية للمستخلص الخام ماء- أسيتون (30 / 70 ح/ح) ; الجزء العضوي والجزء المتبقي المائي. تم البحث عن نشاطهم المضاد للأكسدة عن طريق تثبيط الجذر الحر DPPH وقدرة ارجاع الحديد FRAP.

أظهر التحليل النوعي أن المستخلصات الثلاثة غنية بالتانينات و الكينون الحر و التربينويد.

سجل التحليل الكمي محتوى منخفض من التانينات المكثفة في كل المستخلصات. تم ملاحظة أعلى مستويات البوليفينول و الفلافونويد في جزء أسيتات الإيثيل بتركيز $2031 \pm 106,9$ ميكروغرام معادل حمض الغاليك في ميليلغرام الواحد من المستخلص و $593,8 \pm 36,29$ ميكروغرام معادل كاتشين في ميليلغرام الواحد من المستخلص على التوالي.

أظهر جزء أسيتات الإيثيل أقوى نشاط مضاد للأكسدة بقيمة $CI50$ تبلغ حوالي $195,9 \pm 9,35$ ميكروغرام / مل. وقيمة $CE50$ تبلغ حوالي $250 \pm 0,6$ ميكروغرام / مل . يظل هذا النشاط ضعيفاً مقارنة بالنشاط الذي سجله حمض الأسكوربيك بقيمة $IC50$ حوالي 169.01 ± 6.83 ميكروغرام / مل و $EC50$ حوالي 208.333 ± 0.001 ميكروغرام / مل.

تم العثور على علاقة قوية بين محتوى البوليفينول والنشاط المضاد للأكسدة (تثبيط DPPH و FRAP). مما يؤكد أن البوليفينول هي المكونات المضادة للأكسدة السائدة في نباتنا.

الكلمات الرئيسية: النعناع، دراسة كيمو نباتية ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للأكسدة ، DPPH ، FRAP.

Résumé

De nombreuses recherches portent sur l'utilisation des antioxydants naturels pour la prévention et le traitement de différentes maladies. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à une étude phytochimique et à la recherche et à l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits préparés des tiges et feuilles de *Mentha spicata L.* Famille des lamiacées récoltée dans la région Hennaya, wilaya Tlemcen.

Ce travail est initié par un screening phytochimique suivi de dosages des composés phénoliques de l'extrait brut eau-acétone (30/70 : v/v), sa fraction organique acétate d'éthyle et la phase résiduelle aqueuse. La recherche de leur activité anti-oxydante a été effectuée par la méthode de piégeage du radical DPPH et la capacité de réduction de fer (FRAP).

L'analyse qualitative a montré la richesse des trois extraits en tanins, quinones libres et terpénoïdes.

L'analyse quantitative a enregistré une faible teneur en tanins dans tous les extraits préparés. Les taux les plus élevés en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été observés dans la fraction acétate d'éthyle avec des valeurs d'ordre $2031 \pm 106,9 \mu\text{g EAG/ mg E}$ et $593,8 \pm 36,29 \mu\text{g EC/ mg E}$, respectivement.

La fraction acétate d'éthyle a montré l'activité antioxydante la plus puissante avec une valeur de CI_{50} d'ordre $195,9 \pm 9,35 \mu\text{g/ml}$ et une valeur de CE_{50} d'ordre $250 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$. Cette activité reste faible par rapport à celle présentée par l'acide ascorbique qui a enregistré une CI_{50} d'ordre de $169,01 \pm 6,83 \mu\text{g/ml}$ et une CE_{50} d'ordre de $208,333 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$.

Une forte corrélation a été notée entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante (piégeage du DPPH et FRAP). Cela confirme que les polyphénols sont des composants antioxydants prédominants dans notre plante.

Mots clés : *Mentha spicata L.*, Screening phytochimique, Composés phénoliques, Activité anti-oxydante, DPPH, FRAP.

Abstract

A lot of research focuses on the use of natural antioxidants for the prevention and treatment of different diseases. In this context we are interested in a phytochemical study and in the research and evaluation of the antioxidant activity of the different extracts prepared from the stems and leaves of *Mentha spicata L.* Family of lamiaceae harvested in the Hennaya region, wilaya Tlemcen.

This work is initiated by a phytochemical screening followed by dosages of phenolic compounds of the raw water-acetone extract (30/70: v/v), organic fraction and the aqueous residual phase. The search for their antioxidant activity was carried out by the DPPH radical scavenging method and the FRAP iron reduction capacity.

Qualitative analysis showed the richness of all extracts in tannins, free quinones and terpenoids.

Quantitative analysis recorded low tannin content in the three extracts. The highest levels of polyphenols and flavonoids were observed in the ethyl acetate fraction with values of $2031 \pm 106,9 \mu\text{g EAG/ mg E}$ and $593,8 \pm 36,29 \mu\text{g EC/ mg E}$ respectively.

The ethyl acetate fraction showed the most powerful antioxidant activity with an IC₅₀ value of around $195.9 \pm 9.35 \mu\text{g / ml}$ and an EC₅₀ value of around $250 \pm 0.6 \mu\text{g / ml}$. This activity remains weak compared to that presented by ascorbic acid which recorded an IC₅₀ of around $169.01 \pm 6.83 \mu\text{g / ml}$ and an EC₅₀ of around $208,333 \pm 0.001 \mu\text{g / ml}$.

A strong correlation was noted between the polyphenol content and the antioxidant activity (DPPH scavenging and FRAP). This confirms that polyphenols are predominant antioxidant components in our plant.

Keywords: *Mentha spicata L.*, Phytochemical screening, phenolic compounds, Antioxidant activity, DPPH, FRAP

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	5
Tableau 2 : Classification des antioxydants.....	6
Tableau 3 : Classification des antioxydants selon leur niveau d'action.....	7
Tableau 4 : Quelques activités biologiques des métabolites secondaires.....	14
Tableau 5 : Composition chimique de la plante.....	17
Tableau 6 : Caractéristiques des extraits obtenus de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	29
Tableau 7 : Screening phytochimique des différents extraits de <i>Mentha spicata L.</i>	30

Liste des figures

Figure 1: Stress oxydatif : déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants.....	3
Figure 2: Structure de l'acide hydroxy benzoïque.....	9
Figure 3: Structure de l'acide hydroxy cinnamique.....	10
Figure 4: Structure de base des flavonoïdes.....	10
Figure 5: Structure chimique des différents types de flavonoïdes.....	11
Figure 6: Structure de pentagalloyl glucose: Tannin hydrolysable.....	11
Figure 7: Structure de Procyanidine A: Tannin condensé	12
Figure 8: Structure basique des coumarines et ses dérivés	12
Figure 9: Structure de l'isoprène et du terpène.....	13
Figure 10: Photo originale de <i>Mentha spicata L.</i>	16
Figure 11: la partie aérienne (tiges et feuilles) de <i>Mentha spicata</i> séchées et découpées...	19
Figure 12: schéma méthode de préparation d'extraits brut hydro acétonique et sa fraction acétate d'éthyle.....	20
Figure 13: Filtration de l'extrait brut après 48h d'incubation.....	21
Figure 14: Elimination de la chlorophylle par le chloroforme.....	21
Figure 15: Fractionnement de l'extrait brut par l'acétate d'éthyle.....	21
Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.....	31
Figure 17: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	31
Figure 18: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	31
Figure 19: Teneurs en flavonoïdes des extraits préparés de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	32
Figure 20: Teneurs en polyphénols des extraits préparés de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	32
Figure 21: Teneurs en tanins condensés des extraits préparés de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	32
Figure 22: Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique et des extraits préparés de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	34
Figure 23: Les valeurs des CI_{50} des différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i> en comparaison avec l'acide ascorbique.....	34
Figure 24: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et des extraits préparés de la Partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i>	36
Figure 25: Les valeurs des CE_{50} des différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de <i>Mentha spicata L.</i> en comparaison avec l'acide ascorbique.....	37
Figure 26: Courbe de corrélation des CI_{50} en fonction de la teneur en polyphénols des extraits étudiés de <i>Mentha spicata L.</i>	38
Figure 27: Courbe de corrélation des CE_{50} en fonction de la teneur en polyphénols des extraits étudiés de <i>Mentha spicata L.</i>	38

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.
CAT: Catalase.
CE50: Concentration efficace à réduire 50% du fer.
CI50: Concentration inhibitrice de 50% de DPPH.
CMI: Concentration minimale inhibitrice.
CYP: Cytochrome P₄₅₀.
DMAPP: Dimethylallyl diphosphate.
DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
E4P: Erythrose 4-phosphate.
ERC: Espèces réactives de chlorure.
ERN: Espèces réactives d'azote.
ERO: Espèces réactives d'oxygène.
ERS : Espèces réactives de soufre.
FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.
Gpx: Glutathion peroxydase.
I (%): Pourcentage d'inhibition.
IPP: Isopentenyl diphosphate.
MVA: Mévalonate.
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NO[•]: Oxyde nitrique.
NO₂[•]: Dioxyde d'azote.
NOS: Oxyde nitrique synthase.
O₂⁻ : Anion superoxyde.
O₃: Ozone.
-OH: Groupement Hydroxyle.
OH[•]: Radical hydroxile.
OMS: Organisation mondiale de la santé.
ONOO[•]: Peroxynitrite.
PEP: phosphoenol pyruvate.
SEM: Erreur standard de la moyenne.
SOD: Superoxyde dimustase.
TCA: Acide trichloracétique.
v/v: Volume sur volume.
µg EC /mg E: Microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait.
µg EAG/ mg E: Microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

Tables des matières

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Stress Oxydatif

1. Stress oxydatif.....	03
1.1. Définition	03
1.2. Les radicaux libres	04
1.3. Maladies liées au stress oxydatif	05
2. Les antioxydants	06

Chapitre 2 : Métabolites secondaires

1. Définition des métabolites secondaires	08
2. Biosynthèse des métabolites secondaires	08
3. Classification des métabolites secondaires	09
3.1. Les polyphénols	09
3.1.1. Les acides phénoliques	09
3.1.2. Les flavonoïdes	10
3.1.3. Les tannins	11
3.1.4. Les coumarines	12
3.2. Les composés azotés (Alcaloïdes).....	13
3.3. Les terpènes.....	13
4. Activités biologiques des métabolites secondaires	14

Chapitre 3 : plante étudiée

1. Description de la menthe verte.....	15
2. Habitat.....	16

3. Taxonomie.....	16
4. Composition chimique de la plante	17
5. Activités biologiques de la plante	17
5.1.Activité anti-inflammatoire	17
5.2.Cytotoxicité	17
5.3.Activité antimicrobienne	18
5.4.Activité antioxydante	18

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal	19
2. Préparation des extraits.....	19
3. Calcul du rendement	21
4. Les tests phytochimiques	22
4.1. Les composés phénoliques.....	22
4.2.Les composés terpéniques.....	23
4.3.Les composés azotés (les alcaloïdes).....	23
4.4.Les composés réducteurs.....	23
5. Dosage des composés phénoliques.....	23
5.1.Dosage des polyphénols totaux	23
5.2.Dosage des flavonoïdes	24
5.3.Dosage des tanins condensés	25
6. Recherche d'activité anti-oxydante des extraits étudiés.....	25

6.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	25
6.2. Pouvoir réducteur de fer.....	27
7. Etude statistique	28
Analyse de corrélation	28

Résultats et interprétations

1. Caractéristiques des extraits étudiés.....	29
2. Etude phytochimique.....	29
2.1. Tests phytochimiques.....	29
2.2. Dosage des composés phénoliques	30
3. Activités antioxydantes.....	33
3.1. Test de piégeage du radical DPPH	33
3.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	36
3.3. Analyse de corrélation.....	37
Discussion	39
Conclusion et perspectives.....	43
Références bibliographiques.....	45

Introduction

Dans les cellules saines, il existe un équilibre entre les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les différents systèmes de défense enzymatique et non enzymatique. La surproduction de ces espèces provoque un déséquilibre d'où la naissance d'un stress oxydatif. Et par conséquent de nombreuses maladies apparaissent comme le cancer, les problèmes cardiovasculaires, le diabète sucré et même le vieillissement (**Aruoma, 1998**).

La nature est très riche en ressources aux propriétés bénéfiques pour l'homme (**Rebbas et al., 2012**). Depuis longtemps, l'être humain s'est préoccupé à satisfaire ses besoins alimentaires et sanitaires. Il a développé une relation intime avec le milieu qui l'entourait. Il a appris à utiliser un grand nombre d'espèces végétales à des fins traditionnelles et médicinales (**Pousset, 1989 ; Snoussi et al., 2015**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65 à 80% de la population dans les pays en développement dépendent et utilisent les plantes médicinales traditionnelles pour leur soin de santé primaire (**OMS, 2002**).

Une des particularités de ces plantes est leur capacité à synthétiser des métabolites secondaires. Ce sont des composés naturels dotés des activités biologiques très importantes et appartenant à 3 groupes chimiques: les composés phénoliques, les composés azotés (alcaloïdes) et les composés terpéniques (les terpènes) (**Bourgaud et al., 2001 ; Macheix et al., 2005**).

De nos jours, ces composés représentent des substances précieuses en pharmacie, en cosmétologie, en alimentation et en industrie. Elles sont très utilisées comme des agents anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiseptiques et comme agents antioxydants (**Bourgaud et al., 2001 ; Kar, 2007**).

Plusieurs études algériennes se sont intéressées à développer la médecine traditionnelle et les traitements à base de plantes compte tenu du véritable réservoir phylogénétique, la richesse et la multiplicité de la flore de ce pays (**Rebbas et al., 2012 ; Hamel et al., 2018**)

L'espèce *Mentha spicata* L., est une plante aromatique de la famille des lamiacées très cultivée en Algérie et utilisée diversement pour ses propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (**Quezel et Santa, 1962 ; Chrysargyris et al., 2018**).

Notre travail a pour objectifs l'analyse phytochimique ainsi que la recherche et l'évaluation de l'activité antioxydante (*in vitro*) des extraits préparés de la partie aérienne de la menthe verte (*Mentha spicata L.*).

Il est composé de deux parties :

Première partie : la synthèse bibliographique, divisée en trois chapitres :

1. Stress oxydatif
2. Métabolites secondaires
3. La plante étudiée

Deuxième partie : la partie expérimentale où nous allons procéder à une préparation des extraits à partir des tiges et feuilles de cette plante , une analyse phytochimique, le dosage des différents composés phénoliques et la recherche et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés par la méthode de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de fer FRAP.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1 :

Stress oxydatif

L'organisme vivant subit un phénomène d'oxydation à l'état naturel. C'est un processus complexe, difficile à étudier à cause d'utilisation des espèces moléculaires très réactives et très labiles. Il se fait de manière irréversible, c'est-à-dire, une cascade de réactions en chaîne qui ne s'arrête qu'une fois toute la matrice mitochondriale est oxydée. En revanche, il peut être influencé par un système de défense, par exemple l'intervention des agents de terminaison comme les antioxydants (Rolland, 2004).

1. Stress oxydatif

1.1. Définition

C'est un équilibre qui est rompu entre les systèmes oxydants (espèces réactives) et les défenses antioxydants d'un organisme (Hamma et al., 2015). Ceci est à l'origine dû à la fumée de tabac, à la pollution, aux rayons du soleil, à la suite d'efforts physiques intenses...(Figure 1) (Rolland, 2004).

En d'autres termes, c'est lorsque la cellule n'arrive pas à détruire de manière adéquate le surplus de radicaux libres formés par la mitochondrie (Pham-Huyetal., 2008).

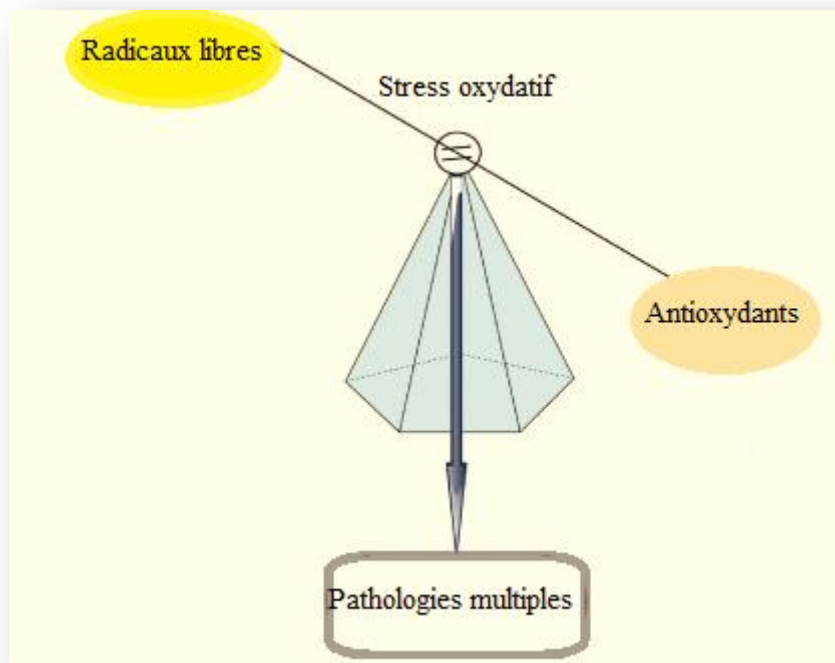


Figure 1: Stress oxydatif: déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants (Ighodaro et Akinloye, 2018).

1.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (molécule ou atome) qui possède un électron non apparié (Afonso et al., 2007).

Les radicaux sont des molécules chargés ou neutres, non stables qui cherchent à capter un électron dans leur environnement pour le retour à l'état le plus stable (Rolland, 2004).

Dans le système vivant, les radicaux libres sont synthétisés de façon continue. Ils ont un effet dans tout l'organisme et peuvent se manifester dans de nombreuses pathologies. Ces éléments touchent toutes les molécules biologiques qui possèdent des doubles liaisons conduisant à leurs très grandes réactivités vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN (Goudable et favier, 1997).

Il existe plusieurs sources de formation des radicaux libres :

- Le métabolisme cellulaire de l'O₂ et les réactions d'oxydo-réduction au niveau de la mitochondrie ;
- La conversion des phospholipides membranaires en acide arachidonique par la phospholipase A2, par la voie des cyclo-oxygénases et des lipo-oxygénases produit l'anion superoxyde (O₂⁻) ;
- Les polynucléaires grâce à leur richesse en oxydase. Lors de l'inflammation, elles consomment rapidement l'oxygène provoquant la formation des radicaux libres comme l'O₂⁻ et l'H₂O₂ qui leur servent à détruire les bactéries, les parasites ...
- Dans le réticulum endoplasmique, leur synthèse se fait par le cytochrome P₄₅₀ (CYP) en oxydant les acides gras insaturés et les xénobiotiques (Babior, 1984 ; Morel et al., 1999 ; Vergelly et Rochette, 2005).

Les espèces réactives peuvent être classées en 4 groupes selon l'atome principal : espèces réactives d'oxygène (ERO), espèces réactives d'azote (ERN), espèces réactives de soufre (ERS) et espèces réactives de chlorure (ERC) (Bannister, 2007).

Le tableau 1 présente les principales ERO et ERN.

Tableau 1 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Simic et al., 1989 ; Moreno et Reyes, 2014).

Espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Simic et al., 1989).	Espèces réactives de l'azote (ERN) (Moreno et Reyes, 2014)
Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	Oxyde nitrique (NO^{\bullet})
Le radical hydroxyle (OH^{\bullet})	Peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$)
Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	Dioxyde d'azote (NO_2^{\bullet})
Oxygène singulet (1O_2) et ozone (O_3)	

Les radicaux libres les plus abondamment synthétisés sont les ERO (Sosa et al., 2013). Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l' O_2 et l'eau (Fontaine, 2007). Ils ont une demi vie de quelques nanosecondes à quelques heures tout dépend de la stabilité des molécules (Sosa et al., 2013). Ils rentrent dans divers processus physiologiques (Favier, 2003). Leurs accumulations peuvent devenir toxique et peuvent sérieusement altérer les membranes cellulaires et d'autres composants comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Valko et al., 2006). Ces derniers une fois modifiés, vont perdre leurs activités essentielles ce qui retentit sur la physiologie cellulaire (Fontaine, 2007).

Les ERN sont synthétisés principalement sous l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Muriel, 2009). Leurs demi-vies longues les rendent plus nuisibles par rapport aux ERO (Balazy et Nigam, 2003).

1.3. Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies comme le cancer et les pathologies oculaires (cataracte, dégénérescence maculaire) (Favier, 2003). La maladie d'Alzheimer, le syndrome de parkinson idiopathique et la sclérose latérale amyotrophique sont ses altérations les plus courantes (Desport et Cauratier, 2002).

Il est également l'un des facteurs qui provoque l'apparition de détresse respiratoire aigüe, l'œdème pulmonaire, l'accélération du vieillissement, le diabète sucré, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003 ; Montagnier et al., 1998).

2. Les antioxydants

C'est une substance qui avec des concentrations faibles est capable de rentrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et d'empêcher leur oxydation (Tableau 2) (Berger, 2006).

Tableau 2 : Classification des antioxydants (Haleng et al., 2007 ; Hokayem et al., 2012).

	D'origine endogène	D'origine exogène (provient de l'alimentation)
Système de défense non enzymatique	Glutathion	Vitamine C
	Acide urique	Vitamine E
	Nicotinamide adénine Dinucléotide phosphate (NADPH)	Caroténoïde
	Coenzyme Q	Polyphénols
	Albumine, Bilirubine	
Système de défense enzymatique	Superoxyde dimustase (SOD)	
	Catalase (CAT)	
	Glutathion peroxydase (Gpx)	
Oligoéléments		Sélénium (Se)
		Cuivre (Cu)
		Zinc (Zn)

Une autre classification effectuée par Ighodaro et Akinloye (2018) consiste à classer les antioxydants en 4 lignes de défense selon leur niveau d'action qui peuvent être une prévention radicale, un nettoyage radical ou une réparation des dommages induits par les radicaux (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des antioxydants selon leur niveau d'action (**Ighodaro et Akinloye, 2018**).

Les lignes de défense	Niveau d'action	Exemple d'antioxydant
1^{ère} Ligne de défense	<p>-Supprimer ou prévenir la formation des Radicaux libres.</p> <p>-Ils sont très rapides dans la neutralisation de n'importe quelle molécule capable de se transformer en radical libre ou tout radical libre capable de provoquer la formation de d'autres radicaux libres (Ighodaro et Akinloye, 2018).</p>	<p>-Superoxyde dimustase</p> <p>-Catalase</p> <p>-Glutathion peroxydase</p>
2^{ème} Ligne de défense	<p>Ces des antioxydants piègeurs.</p> <p>- Ils captent les radicaux libres pour empêcher l'initiation de la chaine de peroxydation lipidique membranaire.</p> <p>- Ils leurs neutralisent en leur donnant un électron, donc ils deviennent eux même des radicaux libres mais moins nocifs et facilement dégradables par d'autres antioxydants (Ighodaro et Akinloye, 2018).</p>	<p>-Acide ascorbique</p> <p>-Acide urique</p> <p>-Glutathion</p> <p>-Vitamine E</p> <p>-Ubiquinol</p>
3^{ème} Ligne de défense	<p>-Agissent une fois les radicaux libres sont formés.</p> <p>-Ils favorisent la réparation des dommages induits par les radicaux libres (ADN, protéines, lipides endommagés).</p> <p>-Ils jouent aussi un rôle dans le nettoyage (dégradent et éliminent l'ADN, les protéines et les lipides oxydés) pour éviter leurs accumulations et donc leurs toxicités (Ighodaro et Akinloye, 2018).</p>	<p>-Système enzymatique de réparation de l'ADN (polymérase, nucléase, glycosylase)</p> <p>-Enzymes protéolytiques (protéinase, protéase, peptidase)</p>
4^{ème} Ligne de défense	<p>-Ils impliquent un mécanisme d'adaptation dans lequel ils utilisent un signal nécessaire pour la production des radicaux libres. Le signal généré par le radical libre provoque la formation et l'orientation de l'antioxydant approprié vers son site d'action (Poli et al., 1993).</p>	

Chapitre 2 :

Métabolites secondaires

Les plantes se distinguent de la plupart des êtres vivants par leur capacité à fabriquer des substances naturelles très diversifiées. Des molécules qui ont un rôle important dans la nutrition, la croissance et la survie de l'espèce végétale sont qualifiées de métabolites primaires (glucides, protéines et lipides). D'autres, qui ne semblent pas participer dans les mécanismes vitaux du développement végétal sont appelées des métabolites secondaires (**Zhao et al., 2013**).

1. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques appartenant à 3 groupes : les composés phénoliques, les composés azotés (alcaloïdes) et les composés terpéniques (les terpènes) et qui sont répartis de façon inégale chez les espèces végétales ou même entre différentes sous-espèces (**Macheix et al., 2005**).

Ces éléments ne sont pas synthétisés directement lors de la photosynthèse, mais via des réactions chimiques ultérieures (**Kechida et Meghiche, 2019**).

2. Biosynthèse des métabolites secondaires

Plusieurs voies métaboliques permettent la biosynthèse des métabolites secondaires. Parmi ces voies on peut citer :

➤ La voie shikimate: C'est une voie métabolique permettant la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Elle se déroule chez les bactéries, les champignons et les plantes (**Herrmann et Weaver, 1999 ; Amelot, 2010**). C'est une série de réactions convertissant le phospho-enolpyruvate (PEP: intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose 4-phosphate (E4P : intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) en chorismate à partir duquel seront synthétisés les acides aminés aromatiques qui sont des précurseurs pour de nombreux métabolites secondaires indoliques et aromatiques comme les polyphénols (**Macheroux et al., 1999 ; Hoffmann, 2003**).

➤ La voie du mévalonate: Elle se déroule dans le cytoplasme de la cellule végétale. Elle commence par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en Acétoacétyl-CoA. Ce dernier va subir un ensemble de réactions chimiques donnant naissance au mévalonate (MVA). Ensuite, Une série de phosphorylations et une décarboxylation sont nécessaires pour la formation de l'isopentenyl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate

(DMAPP) qui sont des précurseurs pour les isoprénoïdes, l'élément de base des terpènes (Newman et Chappell, 1999 ; Lange et al., 2000 ; Hedl et al., 2004).

➤ La voie de l'acétate: C'est la voie de biosynthèse du squelette des flavonoïdes durant laquelle trois molécules de malonyl coenzyme A (synthétisé à partir de l'acétyl-COA carboxylé) se condense avec le 4-coumaroyl-coenzyme A pour former la chalcone par la chalcone synthase. La chalcone peut subir différentes transformations, variables suivant le type de flavonoïde (Forkmann, 1993; Enaud, 2004).

➤ Certains métabolites secondaires sont synthétisés à partir des acides aminés comme la lysine (Lys), phénylalanine (Phe), tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr). C'est le cas des composés azotés (les alcaloïdes) (Muniz, 2006).

3. Classification des métabolites secondaires

3.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés comportant au moins un noyau aromatique (groupement phénolique) associé à un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH) (Bennetau-Pelissero, 2014). Ils peuvent être classés en acides phénoliques, flavonoïdes, tannins, coumarines... En raison de leurs puissantes propriétés antioxydantes. Ils sont très utilisés comme des agents protecteurs contre le cancer et les maladies cardiaques (Cartea et al., 2011).

3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques qui possèdent au moins un hydroxyle phénolique dont l'un des groupes fonctionnels est l'acide carboxylique. Ils sont représentés par 2 sous-classes : L'acide hydroxy benzoïque (Figure 2) et L'acide hydroxy cinnamique (Figure 3) (Jan et Abbas, 2018).

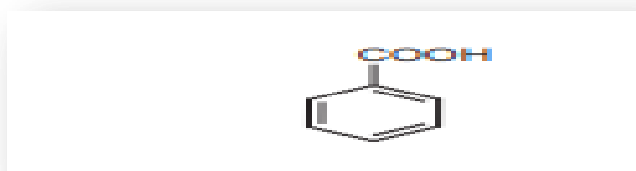


Figure 2: Structure de l'acide hydroxy benzoïque (Saxena et., 2013).

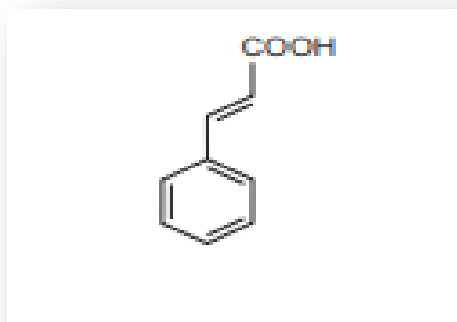


Figure 3: Structure de l'acide hydroxy cinnamique (Saxen a et., 2013).

3.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui se trouvent généralement dans les fruits, les légumes, les fleurs, les noix ... (Ahmad et al., 2015). Ils ont tous une structure commune C6-C3-C6 (Figure 4). Ils sont largement synthétisés dans le réticulum endoplasmique puis transportés et stockés dans les vacuoles de la cellule productrice (Jackson, 2014).

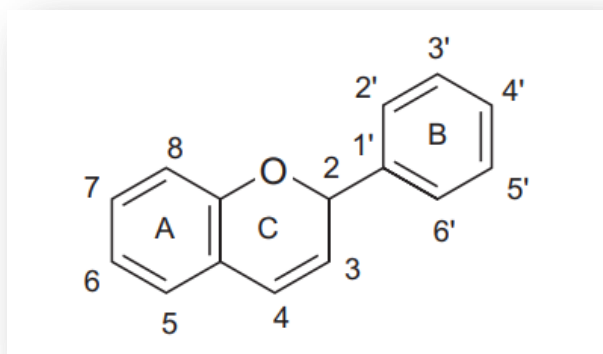


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes (Jackson, 2014).

Selon le type d'hétérocycle, Ils sont divisés en plusieurs classes : Flavone, Flavonol, Flavan-3-ols, Isoflavones, Flavonones, Anthocyanidines,... (Figure 5) (Ignat et al., 2011 ; Manach et al., 2004).

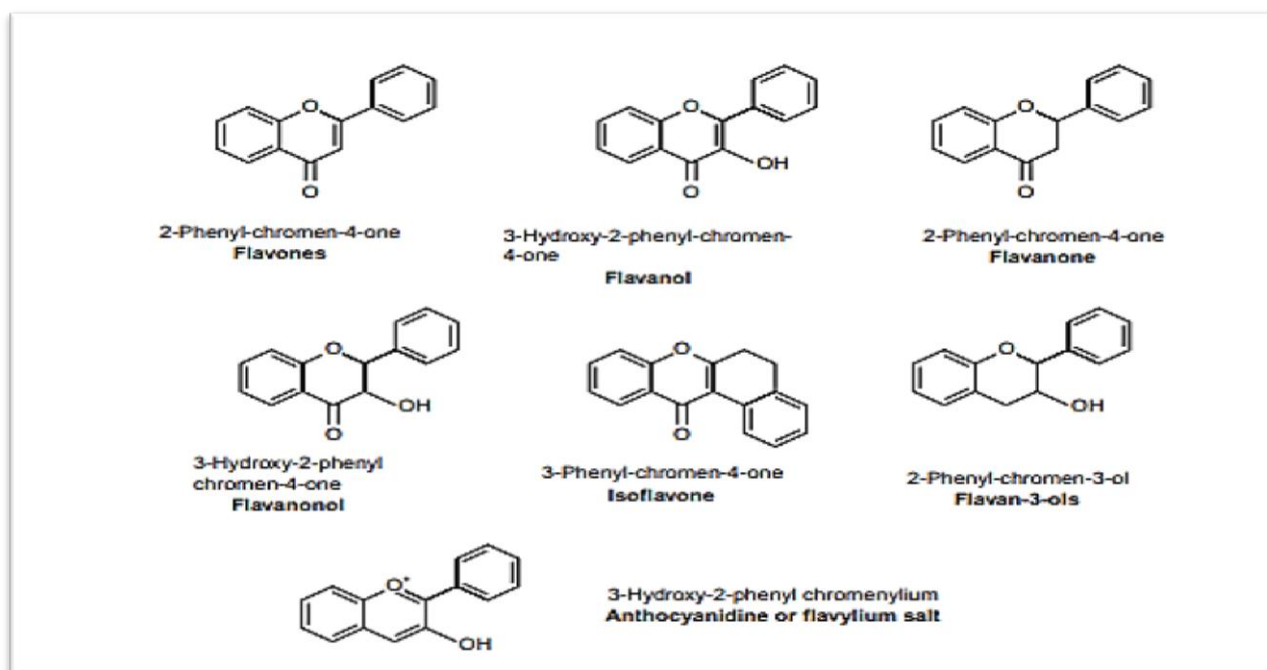


Figure 5: Structure chimique des différents types de flavonoïdes (Saxena et al., 2013).

3.1.3. Les tanins

Les tanins sont un groupe hétérogène de poids moléculaire élevé capable de former des complexes réversibles ou irréversibles avec des protéines, des polysaccharides (cellulose, hémicellulose...), des alcaloïdes, des acides nucléiques, des minéraux ... (Mueller-Harvey et McAllan, 1992 ; Schofield et al., 2001).

Ces composés peuvent être classés en 2 groupes : tanins hydrolysables (Figure 6) et tanins non hydrolysables ou condensés (Figure 7) (Mueller-Harvey, 2001 ; Okuda et Ito, 2011).

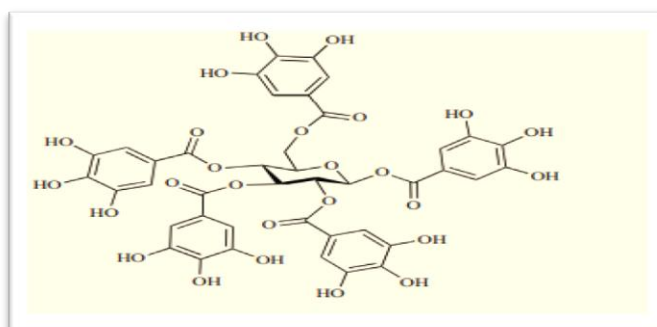


Figure 6: Structure de pentagalloyl glucose: Tanin hydrolysable (Koleckar et al., 2008).

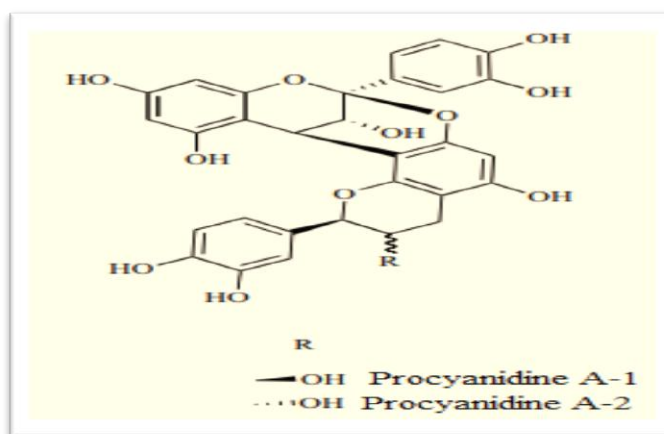


Figure 7: Structure de Procyanidine A: Tanin condensé (Koleckar et al., 2008).

3.1.4. Les coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles connues par leurs agréables odeurs de vanille (Poumale et al., 2013). Elles font parties de la famille des benzopyrones, qui est un hétérocycle bicyclique composé d'un benzène lié à un cycle pyrone (Kurt et al., 2017 ; Srikrishna et al., 2018). Elles peuvent être classées en Coumarine simple(1) Coumarine dimérique (2), Furanocoumarine (Coumarine-7-oxygénée) (3-4) et Pyranocoumarine (5-6) (Figure 8) (Bourgaud et al., 2006).

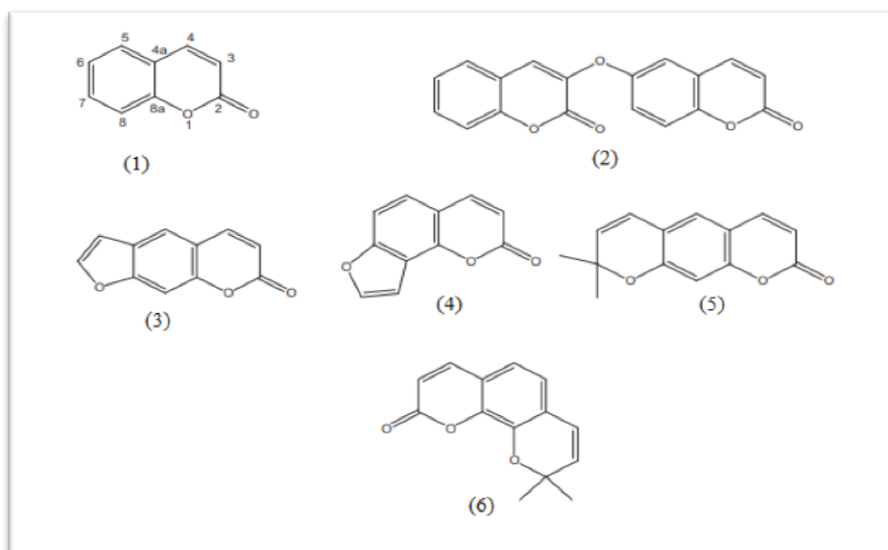


Figure 8: Structure basique des coumarines et ses dérivés (Poumale et al., 2013).

3.2. Les composés azotés (Alcaloïdes)

Les alcaloïdes sont synthétisés par différents organismes comme les plantes, les bactéries, les mycètes et les animaux (**Barbieri et al., 2017**). La majorité sont caractérisées par la présence d'un seul atome d'azote dans un système hétérocyclique, d'autres en ont jusqu'à cinq (**Cushnie et al., 2014**). Ils peuvent être classés en :

- ✓ Alcaloïdes vrais: Des composés dérivés d'acides aminés et comportent un atome d'azote hétérocyclique.
- ✓ Proto alcaloïdes: Des composés où l'atome d'azote n'est pas inclut dans le système hétérocyclique.
- ✓ Pseudo alcaloïdes : Présentent les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ils ne sont pas synthétisés à partir des acides aminés (**Eagleson, 1994 ; Amirkia et Heinrich, 2014**).

3.3. Les composés terpéniques (terpènes)

Les terpènes forment une classe importante des composés aromatiques de nombreuses fleurs, fruits, graines, feuilles, bois et racines (**Jackson,2014**).

Ce sont des hydrocarbures dont l'isoprène est la molécule de base (C_5H_8) (Figure 9) (**Hyldgaard et al., 2012**).

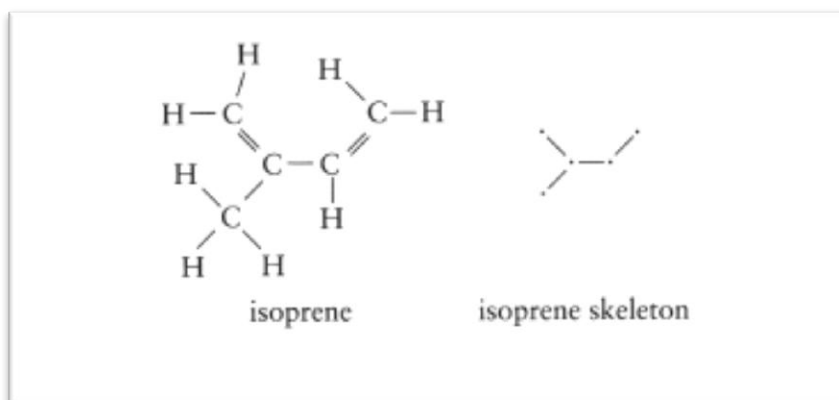


Figure 9: Structure de l'isoprène (**Jackson, 2014**).

Les plus répandus des terpènes sont des mono terpènes ($C_{10}H_{16}$) et des sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Il existe également dans la cellule végétale des chaînes plus longues comme les di terpènes($C_{20}H_{32}$) et les tri terpènes ($C_{30}H_{40}$) ... (**Nazzaro et al., 2013**).

4. Activités biologiques des métabolites secondaires

Actuellement, un nombre considérable de métabolites secondaires est reconnu par ses propriétés pharmacologiques, la raison pour laquelle, ils sont très utilisés en médecine moderne et auparavant en médecine traditionnelle. Nous citerons ci-dessous quelques activités biologiques de ces composés (**Tableau 4**).

Tableau 4: Quelques activités biologiques des métabolites secondaires :

Composés secondaires		Activités biologiques
Les composés phénoliques	Les acides phénoliques	Ils ont un rôle dans la prévention contre les dommages oxydatifs et certains maladies dégénératives comme le cancer, l'inflammation et les maladies cardiovasculaires (Jan et Abbas, 2018).
	Les flavonoïdes	- Ils Constituent une première ligne de défense contre les agents pathogènes microbiens, les insectes ravageurs et les herbivores. -Ils ont un rôle antioxydant important (Jackson, 2014).
	Les tannins	-Très utiles pour guérir plusieurs types de maladies comme la diarrhée, les tumeurs gastriques et duodénales (De bruyne et al., 1999). -Ils sont utilisés comme des médicaments antiseptiques, anti-inflammatoires, antioxydants et hémostatiques (Dolara et al., 2005).
	Les coumarines	-Caractérisées par leur rôle antidépresseur, anticoagulant, anti-inflammatoire, anti-HIV, anticancéreux et antioxydant (Srikrishna et al., 2018).
Alcaloïdes		-Ils sont doués d'un effet antipaludique, antihypertenseur, vasodilatateur, anti tumoral et anti arythmique (Barbieri et al., 2017).
Les terpènes		-Possèdent un effet chimio préventif du cancer, des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, anti hyper glycémiques et anti-inflammatoires (Paduch et al., 2007).

Chapitre 3 :

Plante étudiée

La menthe est une plante herbacée aromatique faisant partie de la famille des lamiacées. Elle est parmi les herbes les plus anciennes et les plus connues au monde (**Prakash et al., 2016**).

Le genre *Mentha* présente 25 à 30 espèces cultivés un peu partout dans les régions tempérées d’Australie, l’Europe, l’Asie et l’Afrique du sud (**Dorman et al., 2003**). L’Algérie est marquée par la culture de 5 espèces majeures qui sont *Mentha rotundifolia* (L.), *Mentha pulegium* (L.), *Mentha spicata* (L.), *Mentha aquatica* (L.) et *Mentha longifolia* (L.) (**Quezel et Santa, 1962**).

Mentha spicata L., couramment connue sous le nom de Naânaâ, est souvent consommée lors de la préparation du thé ou ajoutée aux plats comme arôme. Les feuilles de cette plante sont également utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les troubles biliaires, les crampes menstruelles, les douleurs de l’estomac, la constipation... (**Brahmi et al., 2012**). Son huile est utilisé comme un agent aromatisant du chewing-gum, des dentifrices, en cosmétique, en confiserie et en industrie pharmaceutique (**Mahboubi, 2017 ; Chrysargyris et al., 2018**).

1. Description de la menthe verte

Mentha spicata L., est une herbe vivace de 30 à 100cm de longueur. Elle se caractérise par des tiges et des feuilles variablement glabres à poilues avec des rhizomes qui poussent sous la terre et se diffusent largement. Ses feuilles sont de 5 à 9 cm de longueur et de 1,5 à 3cm de largeur avec un bord dentelé. Elles ont toutes une tige carrée. Les fleurs forment de beaux épis minces roses ou blanches de couleur dont chacune est de 2,5 à 3 mm de longueur et de largeur (Figure 10) (**Snoussi et al., 2015**). Elles sont petites, bisexuelles de différentes formes. Elles comportent un calice sous forme campanulé ou tubulaire à 5 dents et une corolle à 4 lobes presque égaux en forme d’entonnoir qui enserme 4 étamines identiques (**Gaur, 1999**).



Figure 10: Feuilles de *Mentha spicata* L. (Photo Personnel)

2. Habitat

Les espèces de menthes sont considérées comme des plantes envahissantes. Une fois plantées elles se développent rapidement et se propagent sans contrôle. Elles préfèrent des environnements et des sols frais et humides semi ombragés ou en plein soleil (Abbaszadeh et al., 2009). Sa floraison a lieu de juillet à septembre / octobre selon les régions.

3. Taxonomie

Selon Landsdown (2014) et Moon et al., (2009) *Mentha spicata* L. peut être classée comme suit :

Règne	Plantea
Sous règne	Trachéophytes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiale
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Neptoideae
Tribu	Menthea
Sous-tribu	Menthinae
Genre	Mentha
Espèce	<i>spicata</i> L.

4. Composition chimique

Le tableau ci-dessous regroupe la composition chimique de la partie aérienne de *Mentha spicata*

Tableau 6: Composition chimique de la partie aérienne de *Mentha spicata*.

Familles du métabolite secondaire	Molécules	Références
Les polyphénols	Acide gallique, Acide 3,4 di hydroxy benzoïque, Acide vanillique, Acide caféique, Acide férulique, Acide rosmarinique.	-Papageorgiou et al., 2008
Les flavonoïdes	Catéchine, Epi catéchine, Rutine, Myricétine, Lutéoline, Apigénine, Naringenine.	-Bimakr et al., 2011
Huile essentielle	Carvone, Limonene, Dipentène, Dihydrocarvéole, Dihydrocarvéole acétate, 1,8-cineole, β -pinene.	-Bhat et al., 2002 ; -Snoussi et al., 2015
Autres constituants	- Chlorophylle a et b, Caroténoïdes. -Xanthophylle (Néoxanthine, Violaxanthine, Lutéine, Zéaxanthine). - Stéroïdes, Saponines, Alcaloïdes, Athraquinones, Quinines.	-Curutchet et al., 2014 ; -Raju et al., 2007 ; -Padmini et al., 2008

5. Activités biologiques

5.1. Activité anti-inflammatoire

Arumugam et al., (2008) ont évalué les effets anti inflammatoire des différentes fractions de l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* chez des rats Albinos Wistar. Ils ont trouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle et aqueux ont été les plus efficaces pour diminuer l'inflammation chronique de 85 % et 53 % respectivement en 24h, et seule la fraction d'acétate d'éthyle qui été efficace pour inhiber 65 % de l'inflammation aigue.

5.2. Cytotoxicité

Une étude faite par **Hajighasemi et al., (2011)** a montré que l'extrait aqueux de *Mentha spicata* a significativement réduit la prolifération des lignées cellulaires tumorales (fibrosarcome de souris ainsi que des cellules de la leucémie monocyttaire humaine) à partir de 2,5 mg/ml de concentration d'extrait après 24h d'incubation.

5.3. Activité antimicrobienne

Scherer et al., (2013) ont démontré lors de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) que les extraits de *Mentha spicata* obtenus avec du méthanol, de l'acétone et de dichlorométhane n'ont pas montré une activité significative contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, tandis que son huile essentielle a été plus efficace pour inhiber leur croissance. *S. aureus* été le plus sensible avec une concentration d'extrait de 0,67mg/ml qui a montré une inhibition de 100 %de croissance).

5.4. Activité antioxydante

Mata et al., (2007), ont trouvé que l'extrait aqueux de cette plante a une activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée par rapport aux 4 autres espèces étudiées avec une CI_{50} de $5,7 \pm 0,4\mu\text{g/ml}$.

Partie

Expérimentale

Matériel
et
Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein de laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico- chimie, synthèse et activité biologique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV – STU), Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et la recherche et l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits préparés à partir de la partie aérienne de la menthe verte (*Mentha spicata* L).

1. Matériel végétal

La partie aérienne (tiges et feuilles) de *Mentha spicata* a été récoltée durant le mois d'octobre 2019, dans la région de Hennaya (wilaya de Tlemcen). Les tiges et les feuilles ont été séchées dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Une fois séchées, elles ont été découpées en petites morceaux (Figure 11).



Figure 11: la partie aérienne (tiges et feuilles) de *Mentha spicata* séchée et découpée (photo de laboratoire).

2. Préparation des extraits

Trois extraits ont été préparés à partir de la partie aérienne de *Mentha spicata* : un extrait brut eau-acétone (30/70 : v/v), préparé par la méthode d'infusion suivie d'une macération et deux extraits obtenus après fractionnement de l'extrait brut par l'acétate d'éthyle (fraction organique et la phase aqueuse résiduelle) (Figure 12).

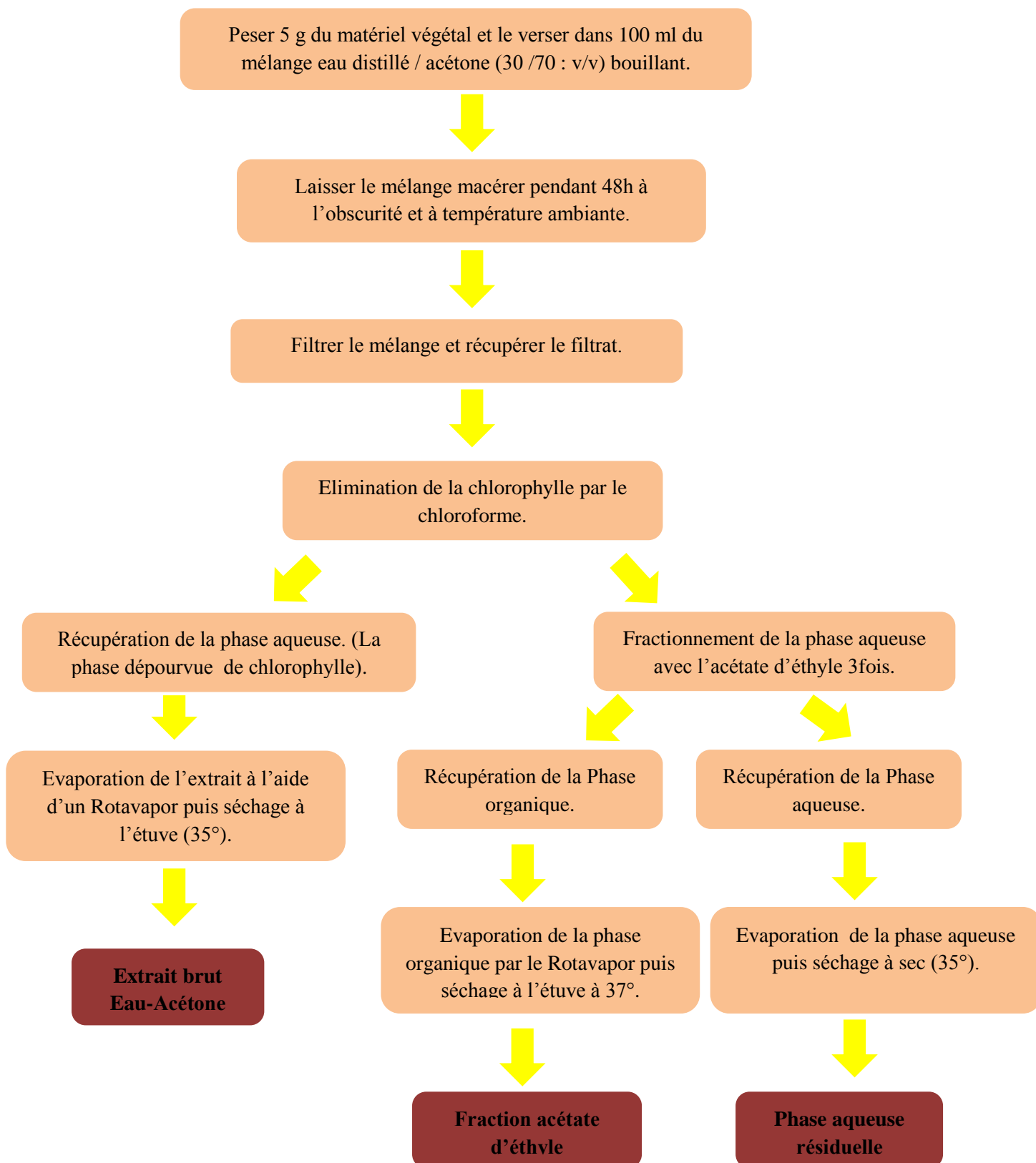


Figure 12: schéma méthode de préparation d'extraits brut eau-acétone et sa fraction acétate d'éthyle.

Après élimination du solvant, les 3 extraits ont été récupérés pour le calcul du rendement, l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques et enfin pour l'évaluation de l'activité antioxydante.



Figure 13: Filtration de l'extrait brut après 48h d'incubation.



Figure 14: Elimination de la chlorophylle par le chloroforme.



Figure15: Fractionnement de l'extrait brut par l'acétate d'éthyle.

3. Calcul du rendement

Le pourcentage du rendement de chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

Avec :

R: Rendement exprimé en %.

M: masse de l'extrait obtenu après évaporation exprimée en gramme (g).

M₀: masse initiale du matériel végétal en (g).

4. Les tests phytochimiques

Ce sont des tests qualitatifs réalisés essentiellement pour mettre en évidence la présence ou l'absence des différents groupements des composés chimiques dans notre plante. La détection se fait soit par un virage de couleur ou la formation d'un précipité, en utilisant les procédures standards décrites par **Harborne (1998)** et **Trease et Evans (1989)**.

Les résultats ont été exprimés comme suit :

+++ : Fortement positif ++ : moyennement positif + : faiblement positif - : négatif

4.1. Les composés phénoliques

➤ Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

➤ Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser, puis ajouter 1ml d'acide chlorhydrique HCl (1%) et quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est indiquée par une coloration rose, rouge ou jaune.

➤ Les quinones libres

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser, puis ajouter 0,1ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1%). Un virage de couleur jaune, rouge ou violet prouve la présence des quinones libres.

➤ Les anthraquinones

Dans un tube à essai, ajouter à 1 ml d'extrait à analyser, 1ml de NH_4OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

4.2. Les composés terpéniques

➤ Les terpénoïdes (Test de Slakowski)

1ml de l'extrait est ajouté à 0,4ml de chloroforme et 0,6ml d'acide sulfurique concentré. La formation à l'interphase d'un anneau marron-rouge indique leurs présences.

➤ Les saponines (Test de mousse)

Dans un tube à essai, introduire 10ml d'extrait à analyser, puis agiter fortement pendant 15secondes. La présence des saponines est indiquée par la formation d'une mousse persistante d'une hauteur supérieure à 1 cm.

4.3. Les composées azotées (les alcaloïdes)

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5ml d'extrait, acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl (1%). Ajouter au premier tube 0,5ml de réactif de Mayer et au deuxième tube 0,5ml de réactif de Wagner. La présence des alcaloïdes est indiquée par l'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement.

4.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

5. Dosage des composés phénoliques

5.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Afin de doser la teneur en polyphénols des trois extraits étudiés, nous avons suivi le protocole décrit par **Vermerius et Nicholson (2006)**.

Le réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune est composé de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation par les composés phénoliques en un nouveau complexe molybdène – tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725nm. Cette couleur est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans les extraits.

➤ Mode opératoire

- ✓ Mélanger 100 μ l de chaque extrait (1mg/ml) avec 2000 μ l de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2 %) ;
- ✓ Agiter et incuber les tubes pendant 5min à température ambiante ;
- ✓ Ajouter 100 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) ;
- ✓ Incuber pendant 30min à température ambiante et à l'obscurité ;
- ✓ Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 725 nm ;

En parallèle, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires à partir de l'acide gallique à différentes concentrations (150 à 450 µg /ml) ;

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/ mg E).

5.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode décrite par **Ardestani et Yazdanparast (2007)**.

Le principe de cette méthode repose sur l'oxydation des flavonoïdes dans un milieu alcalin en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et devient rose en présence de la soude (NaOH) qui absorbe à 510nm. Cette couleur est proportionnelle aux concentrations en flavonoïdes présente dans les extraits.

➤ Mode opératoire

- ✓ Diluer 250 µl de chaque extrait (1mg/ml) avec 1000µl d'eau distillée ;
- ✓ Ajouter 75 µl de la solution de nitrite de sodium NaNO_2 (15 %) ;
- ✓ Incuber pendant 6min à température ambiante ;
- ✓ Ajouter au mélange 75 µl de trichlorure d'aluminium AlCl_3 (10%) ;
- ✓ Incuber les tubes pendant 6min à température ambiante ;
- ✓ Ajouter ensuite 1000 µl d'hydroxyde de sodium NaOH (4%) et ajuster le volume total à 2500 µl avec l'eau distillée ;
- ✓ Agiter les tubes et incuber le mélange pendant 15min à température ambiante ;
- ✓ Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 510nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (50 à 400 µg /ml).

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC /mg E).

5.3. Dosage des tanins condensés

➤ Principe

Le dosage des tanins condensés est réalisé par le réactif de la vanilline, selon la méthode décrite par **Sun et al., (1998)**.

Les tanins condensés se dépolymérisent en milieu acide et se transforment en réaction avec la vanilline en anthocyanidols de couleur rouge qui absorbe à 550nm. Cette couleur est proportionnelle à la quantité des tanins condensés présente dans les extraits.

➤ Mode opératoire

- ✓ Mélanger 50 μ l de chaque extrait (1mg/ml) avec 1500 μ l de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) ;
- ✓ Agiter les tubes au vortex et ajouter 750 μ l du HCl (35%) ;
- ✓ Laisser le mélange incubé pendant 20min à température ambiante ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 550 nm.

Une gamme d'étalonnage de la catéchine (100 à1000 μ g /ml) a été préparée dans les mêmes conditions expérimentales.

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μ g EC /mg E).

6. Recherche d'activité antioxydante des extraits étudiés

6.1. Test de piégeage du radical DPPH

➤ Principe

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical libre de couleur violette utilisé pour évaluer l'activité antiradicalaire des différents extraits de plante.

En présence des antioxydants, le radical libre DPPH est réduit en un complexe jaune dont l'intensité de la couleur et l'absorbance sont inversement proportionnelles à la capacité de réduction des radicaux libres présents dans le milieu réactionnel (**Gülçin et al., 2004; Miliauskaset al., 2004**).

➤ Mode opératoire

Nous avons suivi le protocole décrit par **Atoui et al., (2005)** pour mesurer l'activité anti-radicalaire du radical DPPH en présence de chaque extrait :

- ✓ 50ul μ l des différentes concentrations d'extraits (100 à 1000 μ g/ml) sont ajoutés à 1950 μ l du DPPH fraîchement préparé (2,5mg du DPPH dans 100ml de méthanol) ;
- ✓ Un blanc est préparé pour chaque concentration contenant 50 μ l d'extrait et 1950 μ l du méthanol ;
- ✓ En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μ l du méthanol avec 1950 μ l du DPPH ;
- ✓ L'ensemble des tubes sont incubés durant 30min à l'obscurité et à température ambiante ;
- ✓ L'absorbance est mesurée à 517nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.
- ✓ L'acide ascorbique est un antioxydant standard. Il est utilisé comme un contrôle positif à différentes concentrations (50 à 400 μ g/ml).

➤ Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé à partir la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$$

Avec :

I (%): Pourcentage d'inhibition.

A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif.

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

➤ Calcul des CI_{50}

CI_{50} représente la concentration de l'extrait capable d'inhiber 50 % du radical DPPH.

Elle est calculée graphiquement par les régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait étudié (**Sokmen et al., 2004**).

L'extrait le plus efficace est celui qui a la valeur de CI_{50} la plus faible.

6.2. Pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power ; FRAP)

➤ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette méthode est basée sur la capacité antioxydante des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). Cela est évalué par une augmentation de l'intensité de la couleur vers le bleu vert avec une augmentation de l'absorbance qui correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits analysés (**Hubert, 2006**).

➤ Mode opératoire

Nous avons suivi le protocole décrit par **Oyaizu (1986)**, pour évaluer l'activité réductrice du Fer par les extraits étudiés :

- ✓ Ajouter à 100 μl de l'extrait à différentes concentrations (100 à 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 250 μl de la solution tampon (0,2M, pH 6,6) et 250 μl de la solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %) ;
- ✓ Incuber les tubes à 50°C dans l'étuve pendant 20min ;
- ✓ Après refroidissement des tubes, ajouter 250 μl de l'acide trichloracétique TCA (10%) ;
- ✓ Centrifuger le mélange pendant 10 min à 3000 rotation par minutes (rpm);
- ✓ Ensuite, additionner 500 μl d'eau distillée et 100 μl de la solution de trichlorure de fer FeCl_3 (0,1 %) à 500 μl du surnageant ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 700nm contre un blanc.
- ✓ Un control positif représenté par l'acide ascorbique à différentes concentrations (50 à 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été préparé dans les mêmes conditions opératoires.

➤ Calcul des CE_{50}

CE_{50} est définie comme étant la concentration efficace de chaque extrait qui donne une réponse demi maximale (absorbance =0,5)

Elle est calculée à partir de l'équation de régression linéaire des absorbances en fonctions des différentes concentrations de chaque extrait étudié.

L'extrait le plus efficace est celui qui a la valeur de CE_{50} la plus faible.

7. Analyse statistique

Dans notre travail nous avons calculé les moyennes et les écarts types des tests répétés 3 fois. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne).

Les graphiques ont été réalisés par le logiciel Microsoft Office Excel 2007. L'analyse statistique a été traitée avec les tests de l'ANOVA one-way (analyse de variance) du logiciel Graph Pad Prism 5 (version 5.03, 2009) suivi par le test de Dunnet pour la comparaison des échantillons avec le contrôle et la détermination des taux de signification. Des valeurs de $p \leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Analyse de corrélation

Une analyse de corrélation a été réalisée entre l'activité antioxydante évaluée par la méthode de piégeage du DPPH et FRAP et les teneurs en polyphénols des extraits étudiés en traçant des courbes linéaires des CI_{50} , CE_{50} en fonction des teneurs en polyphénols.

Plus le R^2 est proche de 1, plus il y a une forte corrélation.

Résultats
et
Interprétations

1. Caractéristiques des extraits étudiés

Dans notre étude, trois extraits de la partie aérienne (tiges et feuilles) de *Mentha spicata* L. ont été récupérés : extrait brut Eau-Acétone (EB), fraction organique acétate d'éthyle (FAE) et une phase aqueuse résiduelle (PR).

Le tableau 7 résume le rendement d'extraction, l'aspect, la couleur et le solvant de solubilité pour chaque extrait récupéré.

Tableau 7: Caractéristiques des extraits obtenus de la partie aérienne de *Mentha spicata* L.

Extrait	Rendement%	Aspect/ couleur	Solubilité
Extrait brut Eau-Acétone (EB)	12,086 %	Cristaux /marron foncée	Eau distillée
Fraction acétate d'éthyle (FAE)	1,025 %	Cristaux/ vert militaire	Méthanol
Phase résiduelle (PR)	12,085 %	Cristaux/ marron foncée	Eau distillée

L'extraction Eau-Acétone (30/70: v/v), de la partie aérienne de *Mentha spicata* L. par une infusion suivie d'une macération (48h), a permis de récupérer un extrait brut hydroacétonique (EB), sous forme de cristaux de couleur marron foncée soluble dans l'eau distillée avec un rendement d'extraction de 12,086%.

L'extraction liquide-liquide de l'extrait brut obtenu (EB), avec de l'acétate d'éthyle, a permis de séparer une fraction organique, acétate d'éthyle (FAE), sous forme de cristaux de couleur vert militaire, soluble dans le méthanol, avec un rendement de 1,025%, et une phase résiduelle aqueuse (PR), sous forme de cristaux de couleur marron foncée soluble dans l'eau distillée avec un rendement d'extraction de 12,085%.

2. Etude phytochimique

2.1. Tests phytochimiques

Nous avons procédé à un screening phytochimique pour rechercher les différents métabolites secondaires contenant dans les 3 extraits obtenus de *Mentha spicata* L.: EB, FAE et PR.

Le tableau suivant regroupe les résultats de cette analyse phytochimique.

Tableau 8: Screening phytochimique des différents extraits de *Mentha spicata L.*

Extraits		EB	FAE	PR
Métabolites secondaires				
Tanins		++	+++	++
Flavonoïdes		+	-	-
Quinones libres		++	+++	++
Anthraquinones		-	-	-
Terpénoïdes		+++	+++	+++
Saponines		+	-	-
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-
Composés réducteurs		-	-	-

+ : faible présence, ++ : présence moyenne, +++ : forte présence, - : absence

Les tests de caractérisation qualitatifs, réalisés sur les trois extraits obtenus de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*, ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, quinones libres, tanins, saponines et des terpénoïdes, dans l'extrait brut hydro acétonique (EB) et seulement les tanins, quinones libres et les terpénoïdes dans la fraction acétate d'éthyle (FAE) et la phase résiduelle (PR).

En revanche, nous avons noté l'absence des anthraquinones, des alcaloïdes et des composés réducteurs dans tous les extraits préparés de *Mentha spicata L.*

2.2. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été effectuée par le réactif du Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude. Alors que les tanins condensés ont été dosés en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 16).

Tandis que les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés sont déterminées à partir des équations de régressions linéaires des courbes d'étalonnage de la catéchine (Figure 17 et 18).

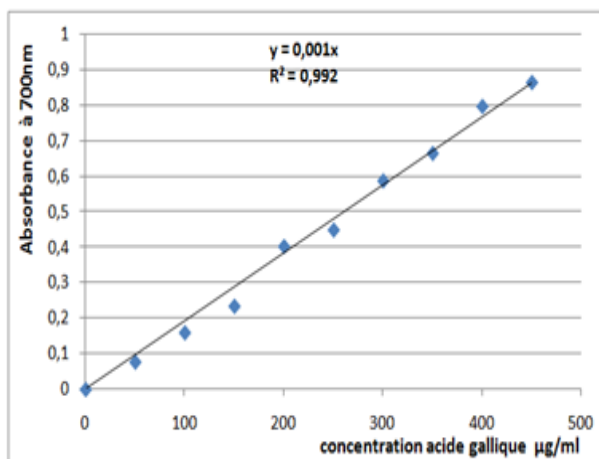


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

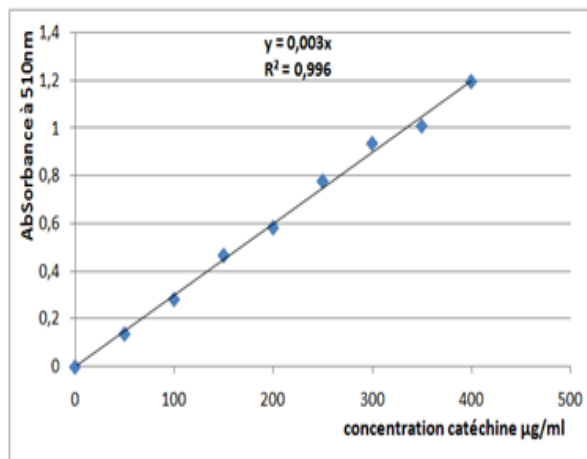


Figure 17: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

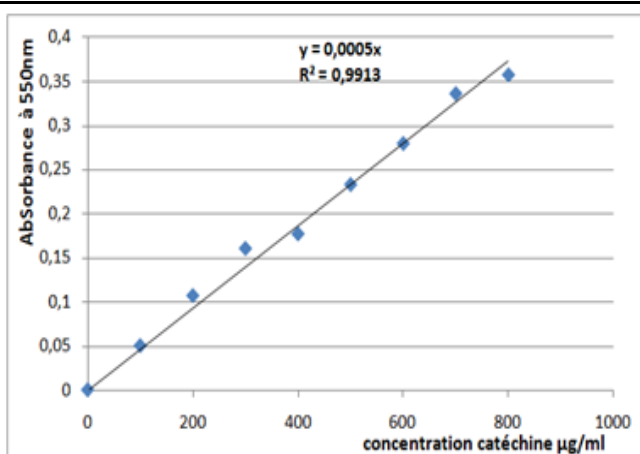
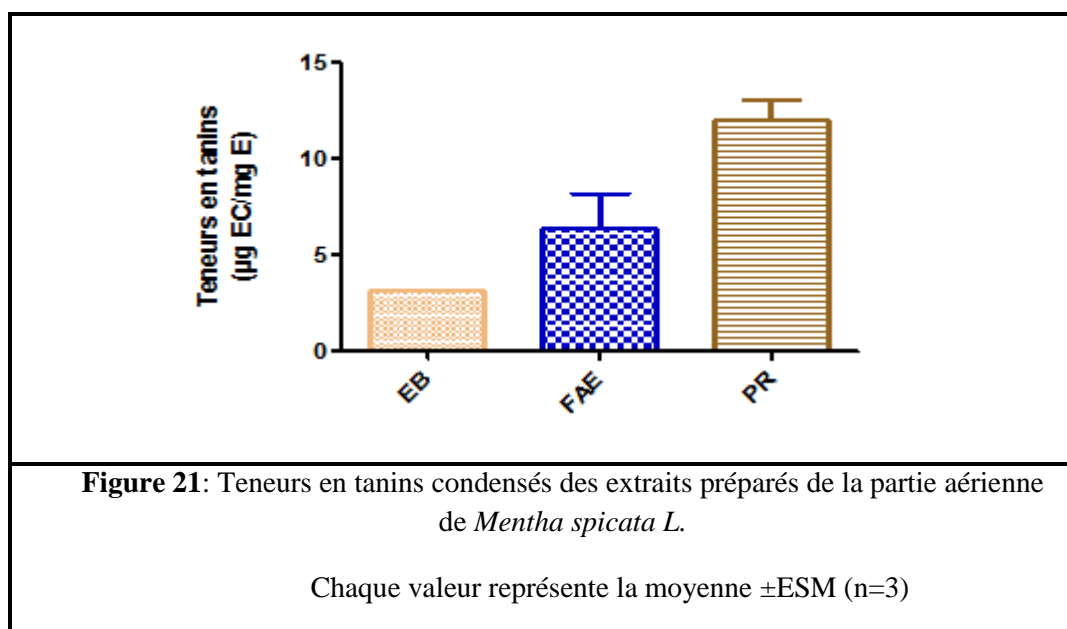
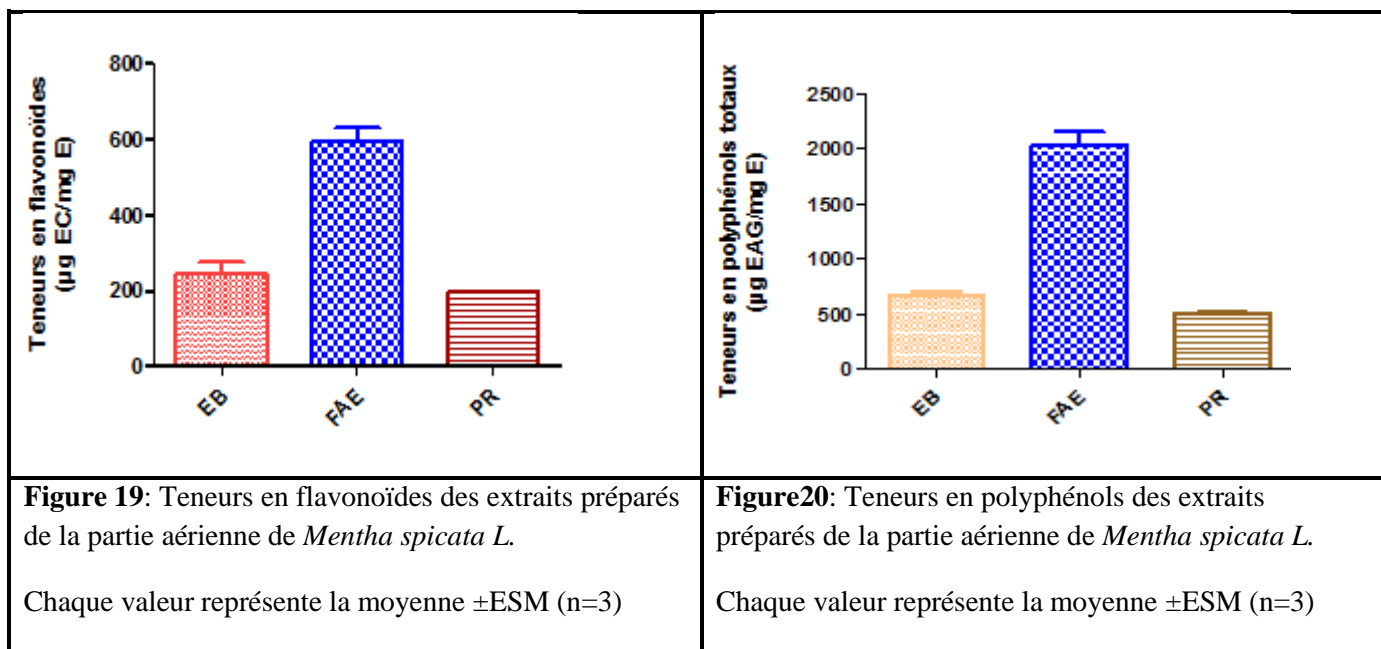


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

Les résultats de dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés de l'extrait brut(EB), Fraction acétate d'éthyle (FAE) et phase résiduelle (PR) de la partie aérienne *Mentha spicata L.* sont représentés dans les figures 19,20 et 21.



Les résultats démontrent une variabilité en teneurs des composés phénoliques dans les trois extraits étudiés de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*

L'extrait organique, acétate d'éthyle (FAE) a enregistré les meilleures teneurs en polyphénols totaux ($2031 \pm 106,7 \mu\text{g EAG/mg E}$) et en flavonoïdes ($593,8 \pm 36,29 \mu\text{g EC/mg E}$).

Cependant, la phase aqueuse résiduelle (PR) a représenté les quantités les moins faibles en polyphénols totaux ($509,6 \pm 10,19 \mu\text{g EAG/mg E}$) et en flavonoïdes ($198 \pm 0,28 \mu\text{g EC/mg E}$).

L'extrait brut eau-acétone (EB) a renfermé des teneurs de $674 \pm 29,98 \mu\text{g EAG/mg E}$ en polyphénols totaux et de $243,8 \pm 31 \mu\text{g EC/mg E}$ en flavonoïdes.

Par ailleurs, les résultats de l'estimation quantitative des tanins condensés, ont démontré des faibles taux en ces composés.

L'extrait brut (EB) a donné le résultat le plus faible avec une teneur d'ordre de $3,13 \pm 0,05 \mu\text{g EC/mg E}$. Alors que la phase aqueuse résiduelle (PR) a enregistré une quantité de $11,98 \pm 1,1 \mu\text{g EC/mg E}$, suivi par la fraction organique acétate d'éthyle (FAE) ($6,36 \pm 1,82 \mu\text{g EC/mg E}$).

3. Activités antioxydantes

3.1. Test de piégeage du radical DPPH

Nous avons évalué la capacité des différents extraits préparés de *Mentha spicata L.* à inhiber le radical libre DPPH. A des fins comparatives, nous avons utilisé un antioxydant de référence : l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme des courbes de renraissions logarithmiques des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique et des extraits étudiés (Figure 22).

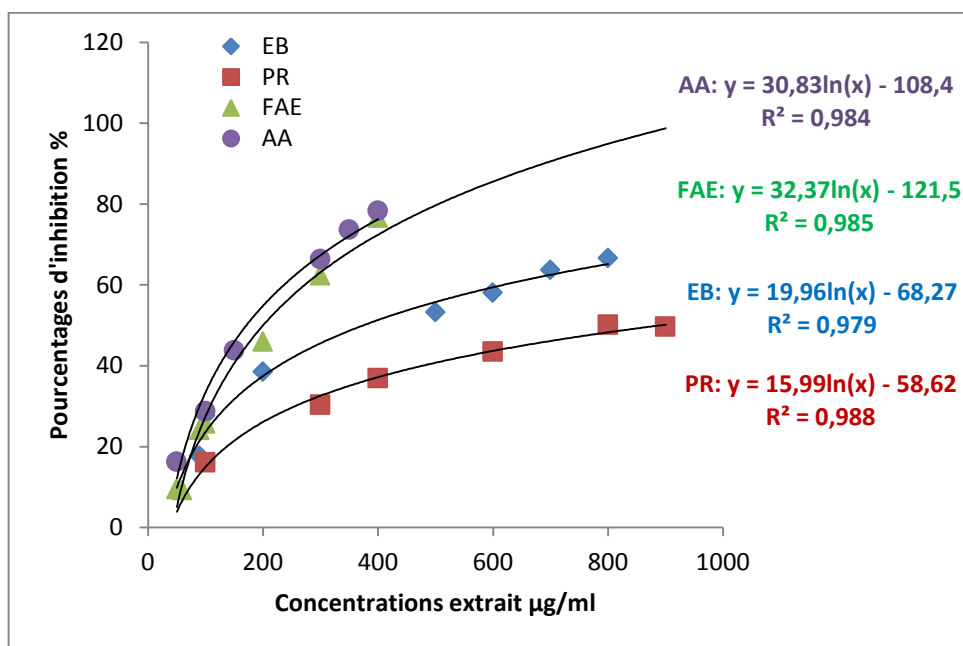


Figure 22: Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique et des extraits préparés de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*

AA: acide ascorbique, EB : extrait brut, FAE : fraction acétate éthyle, PR : phase résiduelle

Les CI_{50} (concentration inhibitrice à 50%) de chaque extrait et de l'acide ascorbique sont déterminées à partir de l'équation logarithmique de chaque graphe et représentées dans la figure suivante (figure23) :

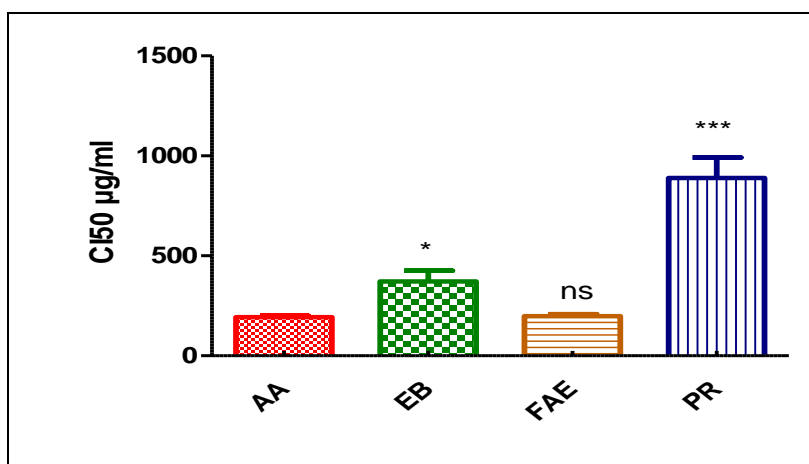


Figure 23: Les valeurs des CI_{50} des différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Mentha spicata L.* en comparaison avec l'acide ascorbique (***: $p \leq 0,001$, *: $p \leq 0,1$, ns : $p \geq 0,05$).

AA: acide ascorbique, EB : extrait brut, FAE : fraction acétate éthyle, PR : phase résiduelle
 Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3).

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que tous les extraits étudiés de *Mentha spicata* présentent la capacité d'inhiber le radical DPPH.

Parmi les extraits testés, la fraction organique acétate d'éthyle a présenté une forte activité de piégeage du radical DPPH avec une CI_{50} d'ordre de $195,9 \pm 9,35 \mu\text{g/ml}$. Elle n'a présentée aucune différence significative avec le standard (CI_{50} acide ascorbique $169,01 \pm 6,83 \mu\text{g/ml}$). Ce qui justifie sa forte activité antiradicalaire.

Par contre, l'extrait brut Eau-acétone (EB) et la phase résiduelle (PR) ont montré des valeurs des CI_{50} significativement élevées par rapport à CI_{50} de l'acide ascorbique, d'ordre de $442 \pm 52,76 \mu\text{g/ml}$ et $913 \pm 103,5 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

3.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP) :

Nous avons utilisé la méthode de FRAP pour évaluer la capacité des extraits préparés de *Mentha spicata* à réduire le fer en comparaison avec celle de l'acide ascorbique (contrôle positif).

Les résultats sont exprimés sous forme des courbes de régression linéaire des absorbances en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique et des extraits préparés (Figure 24).

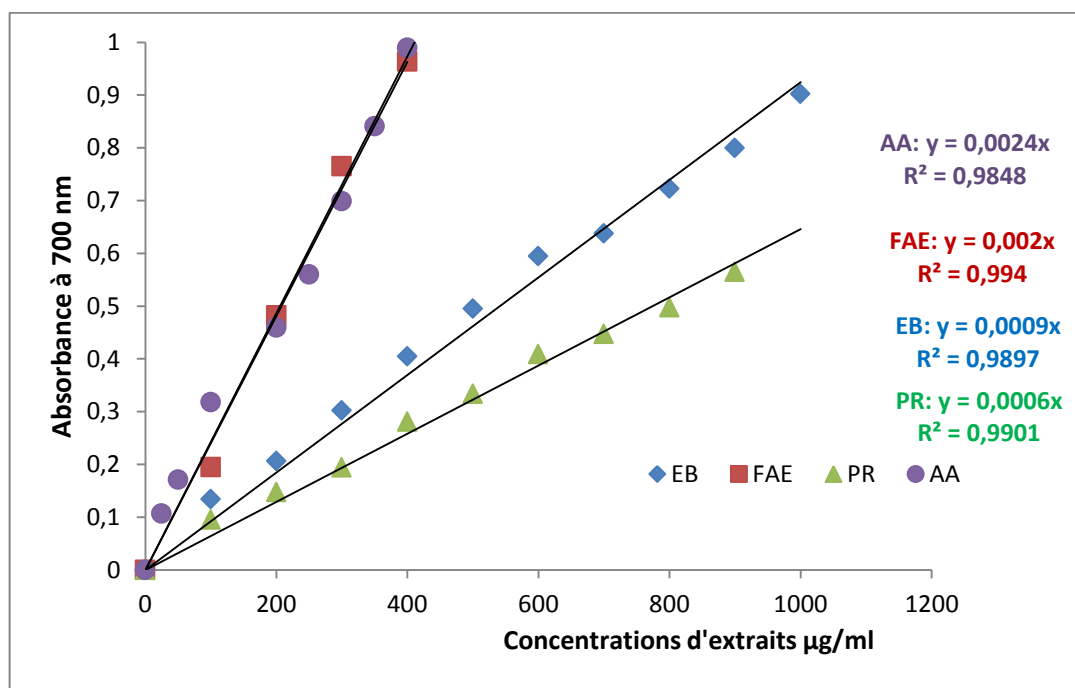


Figure 24: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et des extraits préparés de la partie aérienne de *Mentha spicata* L.

AA: acide ascorbique, EB : extrait brut, FAE : fraction acétate éthyle, PR : phase résiduelle

La concentration efficace à réduire 50% du fer (CE_{50}) est déterminée à partir des équations des courbes linéaires des différents extraits de *Mentha spicata* en comparaison avec l'acide ascorbique.

Les résultats des valeurs des CE_{50} sont mentionnés dans la figure suivante :

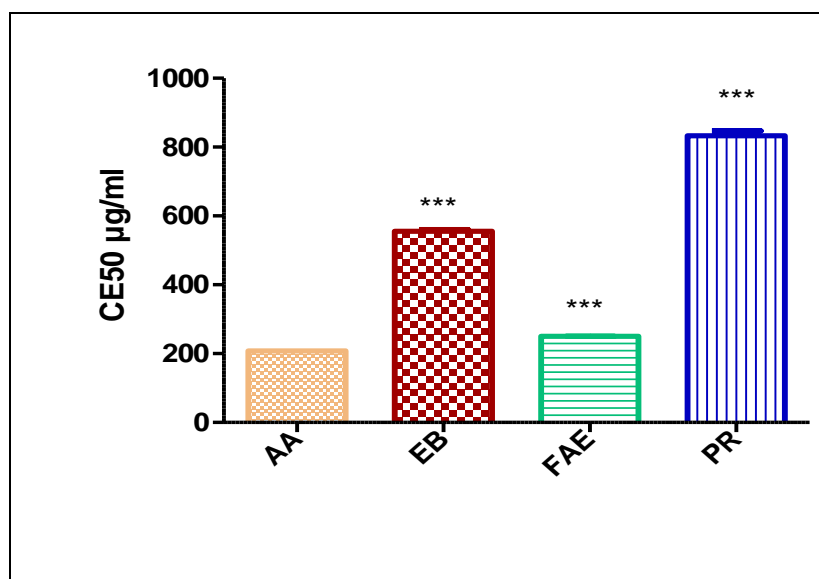


Figure 25: Les valeurs des CE₅₀ des différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Mentha spicata* L. en comparaison avec l'acide ascorbique (***: $p \leq 0,001$)
 AA: acide ascorbique, EB : extrait brut, FAE : fraction acétate éthyle, PR : phase résiduelle.
 Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ESM (n = 3)

Les résultats montrent que tous les extraits de *Mentha spicata* testés peuvent réduire le fer avec des différences significatives avec l'acide ascorbique (CE₅₀=208,333 \pm 0,001 μ g/ml).

La fraction acétate d'éthyle (FAE) a présenté la meilleure activité de réduction de fer avec une CE₅₀ d'ordre de 250 \pm 0,6 μ g/ml.

Tandis que les extraits brut eau-acétone(EB) et la phase résiduelle aqueuse ont marqué des CE₅₀d'ordre de 555,5 \pm 4,87 μ g/ml et de 833,33 \pm 13,65 μ g/ml, respectivement.

3.3 Analyse de corrélation

Nous avons tracé des courbes de corrélations des CI₅₀, CE₅₀ en fonction des teneurs en polyphénols des extraits étudiés (Figure 26 et 27).

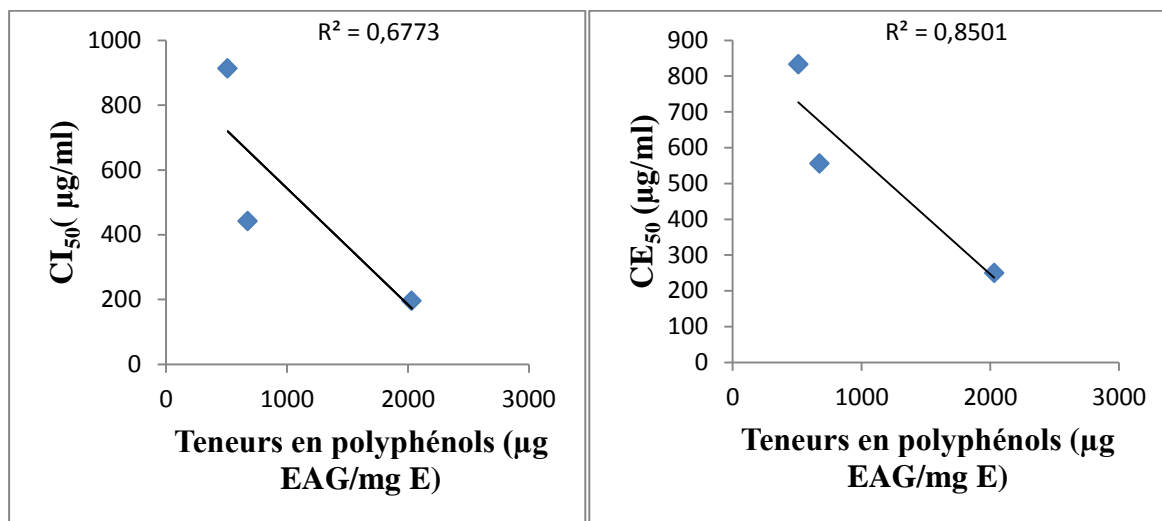


Figure 26: Courbe de corrélation des CI₅₀ en fonction de la teneur en polyphénols des extraits étudiés de *Mentha spicata L.*

Figure 27: Courbe de corrélation des CE₅₀ en fonction de la teneur en polyphénols des extraits étudiés de *Mentha spicata L.*

D'après ces figures, une forte corrélation a été enregistrée entre l'activité antiradicalaire, le pouvoir réducteur de fer et la teneur en polyphénols avec un R²d'ordre de 0,68 et 0,85 respectivement.

Discussion

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité (**Habibouet et al., 2019**). Ces plantes renferment de nombreux antioxydants naturels qui font l'objet de nombreuses recherches de la part des nutritionnistes et des chercheurs pour leurs effets potentiels dans la prévention des maladies chroniques, dégénératives et les dommages dus aux stress oxydatif (**Liu, 2003 ; Scalbert et al., 2005**).

Dans le but de la valorisation des plantes médicinales de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à la famille des lamiacées, qui comporte un nombre important d'herbes culinaires, des plantes médicinales, des plantes alimentaires, des plantes parfumées et d'un grand nombre de plantes ornementales (décoratives) (**Prakash et al., 2016**). La menthe verte (*Mentha spicata L.*) est l'une des espèces importantes de cette famille connue par ses utilisations culinaires et médicinales au Maghreb.

Notre travail vise à réaliser une étude phytochimique, le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés et la recherche et l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits préparés à partir de la partie aérienne de la menthe verte (*Mentha spicata L.*), récoltée dans la région de Tlemcen (Algérie).

Les extraits sont préparés par une infusion suivie d'une macération (48h) en présence d'un mélange eau-acétone (30/70 : v/v), suivie par un fractionnement liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle.

Les rendements d'extractions obtenus dans notre étude sont variables, entre 12,09% pour l'extrait brut eau-acétone et 1,03% pour la fraction acétate d'éthyle. Ces résultats varient d'une étude à une autre.

Mata et al., (2007) ont enregistré un rendement de 7,9g/100g pour l'extrait éthanolique et 75,8g/100g pour l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*

Scherer et al., (2013) ont marqué un rendement de 5,96g/100g pour l'extrait méthanolique, 1,88g/100g pour l'extrait acétonique et 2,72g/100g pour l'extrait dichlorométhane de la partie aérienne *Mentha spicata*.

Brahmi et al., (2012) ont constaté d'après leur étude que les extraits de *Mentha spicata* préparés avec le méthanol, éthanol, et l'acétone ont donné des rendements d'ordre de 11,6%, 4,6% , et 2,6% respectivement. Par contre l'extrait hydroacétonique (75%) a enregistré un meilleur rendement de 20,2%.

Cette variation est probablement due au choix du solvant, à la méthode et au temps d'extraction, à la température et probablement à la région et à la période de récolte aussi ...

Les tests phytochimiques réalisés sur les trois extraits récupérés ont permis d'enregistrer la présence des tanins, des flavonoïdes, des quinones libres dans l'extrait brut eau-acétone et les deux fractions (acétate d'éthyle et la phase résiduelle) de la partie aérienne de *Mentha spicata*. Les saponines et les terpénoïdes ne sont présents que dans l'extrait brut alors que les alcaloïdes, les anthraquinones et les composés réducteurs sont absents dans tous les extraits étudiés.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans l'étude de **El-haoud et al., (2018)** qui ont noté une forte présence des terpènes dans l'extrait d'éther diéthylique de *Mentha spicata*, les quinones dans l'extrait d'éther de pétrole, les tanins dans l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux et les flavonoïdes dans l'extrait aqueux. Ils ont aussi remarqué que les composés réducteurs, les alcaloïdes et saponines sont absents dans les deux extraits aqueux et méthanolique de la menthe verte

En revanche, **Padmini et al., (2008)** ont révélé la présence des flavonoïdes, des saponines, des alcaloïdes et des anthraquinones et l'absence des tanins dans l'extrait aqueux de *Mentha spicata* préparé par infusion.

La présence de certaines familles chimiques et l'absence des autres peut dépendre de certains paramètres comme le site de récolte, la lumière, le type de précipitation, le type de sol, la partie de la plante étudiée ...

La solubilité des composés phénoliques est liée à leurs natures chimiques dans la plante et à la polarité du solvant utilisé (**Mahmoudi et al., 2013**).

Les résultats du dosage des composés phénoliques ont révélé une meilleure teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes d'ordre $2031 \pm 126,9 \mu\text{g EAG/ mg E}$ et $593,8 \pm 36,29 \mu\text{g EC/ mgE}$, respectivement, dans la fraction acétate d'éthyle, fractionnée de l'extrait brut eau-acétone.

Plusieurs études ont été faites sur le dosage des polyphénols et les flavonoïdes des extraits de *Mentha spicata*. Nous citerons:

L'étude faite par **Scherer et al., (2013)**, sur l'extrait acétonique de *Mentha spicata* a présenté une quantité de $37,84 \pm 1,16 \text{ mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec}$.

Brahmi et al., (2015) dans leurs recherches, ont démontré la richesse de l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* en polyphénols avec $12,0 \pm 0,3$ mg EAG/g E et en flavonoïdes avec $2,45 \pm 0,02$ mg d'équivalent quercétine par gramme.

Nous avons utilisé dans notre recherche un solvant hydroacétonique (mélange eau/acétone (30 /70 : v/v)) comme solvant d'extraction des composés phénoliques afin d'augmenter leurs extraction. L'étude faite par **Brahmi et al., (2012)** sur les solvants d'extraction des composés phénoliques de *Mentha spicata* a rapporté que l'extrait à l'éthanol (50%) a présenté des meilleurs teneurs en polyphénols ($39,47 \pm 1,81$ mg EAG / g E). et l'extrait acétonique (75%) a marqué le taux le plus élevé en flavonoïdes ($7,68 \pm 0,02$ mg EQ / g E).

Pour les tanins condensés nous avons enregistré des faibles teneurs en ces composés dans nos extraits. Ils n'ont pas dépassé $11,98 \pm 1,1$ µg EC/mg E, enregistré dans la phase aqueuse résiduelle.

Nos résultats sont en accord avec les résultats rapportés par **Makhloufi et Makhlouf, (2018)** qui ont enregistré des faibles teneurs en tanins condensés comprises entre 29,5 et 33,16 (mg équivalent catéchine / g d'extrait). De même, **Ben-Saad et al., (2017)** et **Benabdallah, (2016)** ont noté des faibles concentrations en tanins condensés dans les extraits préparés de *Mentha spicata* d'ordre de $9,3 \pm 0,45$ et $2,71 \pm 0,1$ mg EC/g d'extrait, respectivement.

La richesse des plantes de la famille des lamiacées en composés phénoliques leurs permet d'avoir une bonne activité antioxydante (**Scherer et al., 2013**). Ce qui a été confirmé par notre travail.

Les résultats du piégeage du radical DPPH ont montré que les extraits préparés à partir de *Mentha spicata* présentent une bonne activité anti-radicalaire. La fraction organique acétate d'éthyle a enregistré une activité anti-radicalaire la plus puissante avec une CI_{50} d'ordre $195,9 \pm 9,35$ µg/ml par rapport aux autres extraits. Néanmoins cette activité reste relativement faible à celle de l'acide ascorbique (CI_{50} : $169,01 \pm 6,83$ µg/ml).

Ceci est expliqué par la richesse de cet extrait en composés phénoliques et la disponibilité des groupements hydroxyles qui ont la capacité de donner leurs électron ou leurs hydrogène formant ainsi un produit final stable (**Jayaprakasha et al., 2008**).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'activité antiradicalaire de notre plante, parmi lesquelles nous citerons :

Mata et al., (2007) ont souligné que l'extrait éthanolique et aqueux de *Mentha spicata* présentent une bonne activité de piégeage du radical DPPH (CI₅₀ d'ordre de 65,2 ± 0,1 µg/ml et 5,7 ± 0,4 µg/ml, respectivement)

De même, l'étude effectuée par **Ben-Saad et al., (2017)** a révélé que l'extrait aqueux de *Mentha spicata* a enregistré une meilleure activité avec une CI₅₀ de 0,58±2,031µg/ml.

Nickavar et al., (2008) ont marqué que l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* présente une CI₅₀ de 87,89 µg/ml alors que **Brahmi et al., (2015)** ont enregistré une activité anti-radicalaire plus forte de l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* avec une CI₅₀ d'ordre de 16, 2 ± 0,2µg/ml.

Concernant FRAP, Nous avons aussi souligné une forte activité réductrice de fer présentée par la fraction acétate d'éthyle avec une CE₅₀ d'ordre 250 ±0,6 µg/ml mais elle reste faible par rapport à celle de l'acide ascorbique qui a enregistré une CE₅₀ 208, 333±0,001 µg/ml.

Bayani et al., (2017) ont révélé un pouvoir de réduction de fer, meilleur par rapport à ceux obtenu dans notre étude, avec une CE₅₀ d'ordre de 26±1,00µg/ml de l'extrait aqueux de *Mentha spicata*.

De même, **Kanatt et al., 2007** ont constaté qu'à une concentration de 500 µg/ml *Mentha spicata* possède la capacité de réduction de fer .

Une forte corrélation a été enregistrée entre l'activité antioxydante testée par la méthode de piégeage du DPPH et le pouvoir réducteur de fer FRAP et la teneur en polyphénols des extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Mentha spicata L.*

Ces résultats suggèrent que l'activité anti-oxydante dépend fortement de la teneur en composés phénoliques ce qui en fait des antioxydants naturels efficaces protégeant le corps humain contre les dommages dus au stress oxydatif.

Conclusion Générale

Conclusion générale

La présente étude s'inscrit dans un cadre d'une étude phytochimique, de dosages des composés phénoliques et de la recherche et de l'évaluation de l'activité antioxydante de trois extraits préparés par une infusion suivie d'une macération de la partie aérienne de *Mentha spicata* L. récoltée dans la région Hennaya, wilaya de Tlemcen.

Les résultats obtenus, nous ont permis d'émettre les conclusions suivantes :

- Un rendement relativement faible a été enregistré par les trois extraits préparés variant de 1,025 % à 12,086%.
- Les tests phytochimiques effectués sur les extraits préparés ont permis de mettre en évidence la présence des tanins, des quinones libres, et des terpénoïdes.
- Le dosage des composés phénoliques a montré la richesse des trois extraits en polyphénols totaux et en flavonoïdes et leur carence en tanins condensés.
- La fraction acétate d'éthyle a enregistré des meilleurs taux en polyphénols totaux et en flavonoïdes d'ordre $2031 \pm 106,9 \mu\text{g EAG/ mg E}$ et $593,8 \pm 36,29 \mu\text{g EC/ mg E}$, respectivement.
- Cette fraction a enregistré l'activité antioxydante la plus importante par le piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de fer FRAP par rapport à l'extrait brut eau-acétone et la phase aqueuse résiduelle avec une CI_{50} d'ordre de $195,9 \pm 9,35 \mu\text{g/ml}$ et une CE_{50} d'ordre $250 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$. Bien que cette activité reste relativement faible par rapport à celle de l'acide ascorbique (contrôle positif) qui a enregistré une valeur de CI_{50} de $169,01 \pm 6,83 \mu\text{g/ml}$ et une valeur de CE_{50} de $208,33 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$ dans les mêmes conditions opératoires.
- Une forte corrélation a été notée entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante.

Ces résultats préliminaires ne représentent qu'une première étape dans nos travaux expérimentaux. Pour compléter et approfondir ce travail, il serait intéressant de :

- ✚ Améliorer le rendement d'extraction par le choix d'autres solvants ou d'autres méthodes d'extractions.
- ✚ Séparation et purification des composés phénoliques par des méthodes chromatographiques : chromatographie sur couche mince, sur colonne, HPLC,...

Conclusion générale

- ✚ Etudier les caractéristiques et les structures des composés phénoliques par des méthodes spectrales comme la spectroscopie infrarouge ou identifier leurs compositions par une spectrométrie de masse.
- ✚ Tester l'influence des paramètres physicochimiques comme la température, le pH... sur la structure des composés phénoliques et donc sur l'activité antioxydante.
- ✚ Effectuer d'autres méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante comme ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ou ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- ✚ Rechercher d'autres activités biologiques : Activité antidiabétique, antimicrobienne, anticancéreuse...
- ✚ Expérimenter l'activité antioxydante de *Mentha spicata L. in vivo* pour confirmer ces résultats.

Références

Bibliographiques

- 1- **Abbaszadeh B., Valadabadi S.A., Farahani H.A., Darvishi H.H. (2009).** Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *African Journal of Plant Science*, 3(10), 217–221.
- 2- **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue Du Rhumatisme*, 74(7), 636–643.
- 3- **Ahmad A., Kaleem M., Ahmed Z., Shafiq H. (2015).** Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections- A review. *Food Research International*, 77, 221-235.
- 4- **Amelot N. (2010).** Couplage Entre Signalisation Calcique et modulation du transcriptome en reponse a la cryptogéine chez des cellules de tabac. Thèse En vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse, Spécialité : Biosciences végétales, P.43.
- 5- **Amirkia V., Heinrich M. (2014).** Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochemistry Letters*, 10, 48-53.
- 6- **Ardestani A., Yazdanparast R. (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium poliumon* in vitro protein glycoxydation. *Food and chemical toxicology*, 45, 2402-2411.
- 7- **Arumugam P., Priya N. G., Subathra M., 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. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 92–95.
- 8- **Aruoma O. I. (1998).** Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(2), 199–212
- 9- **Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005).** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27–36.
- 10- **Babior B. (1984).** The respiratory burst of phagocytes. *J Clin invest*, 73, 599-601.
- 11- **Balazy M., Nigam S. (2003).** Aging, lipid modifications and phospholipases--new concepts. *Ageing research reviews*, 2(2), 191-209.
- 12- **Bannister J. (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine. *B.H.P.O.*, 10, 250–266.
- 13- **Barbieri R., Coppo E., Marchese A., Daglia M., Sobarzo-Sánchez E., Nabavi S. F., et Nabavi S. M. (2017).** Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196, 44–68.

- 14- Bayani M., Ahmadi-hamedani M., Javan A.J. (2017).** Study of Hypoglycemic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Iranian *Mentha Spicata* Leaves Aqueous Extract in Diabetic Rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 16, 75–82.
- 15- Benabdallah A. (2016).** Etude écophysiologique, développement et importance des plantes médicinales du genre *Mentha* dans le parc national d'El-Kala (Nord - EstAlgérie). Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, filière : Biologie Végétale, p.80-81.
- 16- Bennetau-Pelissero C. (2014).** Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 49(4), 151–159.
- 17- 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, b, 43, 77–83.
- 18- Berger M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition Clinique et Métabolisme, 20, 48-53.
- 19- Bhat S., Maheshwari P., Kumar S., Kumar A. (2002).** *Mentha* species: In vitro regeneration and genetic transformation. Molecular Biol Today, 3 (1), 11-23.
- 20- Bimakr M., Abdul Rahman R., Saleena Taip F., Ganjloo A., MdSalleh L., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M. (2011).** Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. Food and bioproducts processing, 89(1), 67–72.
- 21- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161(5), 839–851
- 22- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U. (2006).** Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry reviews, 5,293–308.
- 23- Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K., Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stévigny C., Chibane M., Duez P. (2015).** Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata (L.)*, *M. pulegium (L.)* and *M. rotundifolia (L.)* Huds (Lamiaceae). Industrial Crops and Products, 74, 722-730.
- 24- Brahmi F., Madani K., Dahmoune F., Rahmani T., Bousbaa K., Oukmanou S., Chibane M. (2012).** Optimization of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata L.*). Pharmacognosy Communications, 2(4), 72–86.

- 25- Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011).** Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 16(1), 251–280.
- 26- Chrysargyris A., Solomou M., Petropoulos S. A., Tzortzakis N. (2018).** Physiological and biochemical attributes of *Mentha spicata* when subjected to saline conditions and cation foliar application. *Journal of Plant Physiology*, 232, 27-38.
- 27- Curutchet A., Dellacassa E., Ringuelet J.A., Chaves A.R., Viña S.Z. (2014).** Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha*×*piperita* and *M. spicata*). *Food Chemistry*, 143, 231–238.
- 28- Cushnie T. P. T., Cushnie B., Lamb A. J. (2014).** Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.
- 29- De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A. (1999).** Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 445-459.
- 30- Desport J.C., Couratier Ph. (2002).** Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 253-259.
- 31- Dolaro P., Luceri C., DeFilippo C., Femia A.P., Giovannelli L., Caderni G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A. (2005).** Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1), 237-246.
- 32- Dorman H.J., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. (2003).** Antioxidant prosperities and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4563–4569.
- 33- Eagleson M. (1994).** Concise encyclopedia chemistry, 1 st ed. Walter de Gruyter, Berlin.
- 34- El-haoud H., Boufellous M., BERRAN A., Tazougart H et Bengueddour R. (2018).** Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha Spicata L.* *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7(4), 226-233.
- 35- Enaud E. (2004).** Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques : synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine, Spécialité : Procédés et biotechnologies alimentaires, p. 14-15.
- 36- 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.

- 37- Fontaine E. (2007).** Radicaux libres et vieillissement. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 42(2), 110–115.
- 38- Forkmann G. (1993).** Biosynthesis of flavonoids. In Polyphenolic phenomena. INRA editions, 65-71.
- 39- Gaur R.D. (1999).** Flora of the District Garhwal, North west Himalaya (with Ethnobotanical Notes). Trans Media.
- 40- Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants, Nutrition Clinique et Métabolisme, 11(2), 115-120.
- 41- Gülçin I., Küfrevioğlu I., Oktay M., Büyükkökuroğlu M.E. (2004).** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). Journal of Ethnopharmacology, 90, 205–215.
- 42- Habibou H.H., Idrissa M., Ikhiri Khalid P., Benjamin O. Rabani A. (2019).** Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. European Scientific Journal, 15, 159-171.
- 43- Hajjighasemi F., Hashemi V., Khoshzaban F. (2011).** Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. Journal of Medicinal Plants Research, 5(20), 5142–5147.
- 44- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant, Revue Médicale Liège, 62 (10), 628-638.
- 45- Hamel T., Sadou S., Seridi R., Boukhdir S., Boulemtafes A. (2018).** Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). Ethnopharmacologia, 59, 75-81.
- 46- Hamma S.A., Nouri N., Fergani I., Lakehal A., Abadi N., Benlatreche C. (2015).** Paramètres du stress oxydant d'une population diabétique de type 2 constantinoise. Annales d'endocrinologie, 76, 374–377.
- 47- Harborne J.B. (1998).** Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & hall thomson science (uk). London, 203-234.
- 48- Herrmann K. M., Weaver L. M. (1999).** The shikimate pathway, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50(1), 473-503.
- 49- Hoffmann L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyl transférase, l'Hydroxy Cinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse pour obtenir le titre de Docteur de l'université de Louis Pasteur –STRASBOURG I. Domaine : biologie moléculaire et cellulaire, P. 53.

- 50- Hedl M., Taberner L., Stauffacher C.V., Rodwell V.W. (2004).** Class II 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductases. *Journal of bacteriology*, 186(7), 1927–1932.
- 51- Hokayem M., Bisbal C., Lambert K., Avignon A. (2012).** Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2 ? *Médecine Des Maladies Métaboliques*, 6(4), 327–331.
- 52- Hubert J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : Qualité et sécurité des aliments, p. 174.
- 53- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. (2012).** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 1-24.
- 54- Ighodaro O.M., Akinloye O.A. (2018).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- 55- Ignat I., Volf I., Popa V.I. (2011).** A critical review of methods of characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- 56- Jackson R.S. (2014).** Chemical Constituents of Grapes and Wine. *Wine Science*, 347- 426.
- 57- Jan S., Abbas N. (2018).** Chemistry of Himalayan Phytochemicals. *Himalayan Phytochemicals*, 121-166.
- 58- Jayaprakasha G. K., Girenavar B., Patil B. S. (2008).** Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*, 99(10), 4484–4494.
- 59- Kanatt S. R., Chander R., Sharma A. (2007).** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata L.*) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100(2), 451–458.
- 60- Kar A. (2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. Ed, 2: New age international publishers, 1-30.
- 61- Kechida K., Meghiche M. (2019).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Saccocalyx Satureioides*. Mémoire présenté pour l'obtention Du diplôme de Master de l'Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila, Spécialité : Chimie pharmaceutique, p. 12.

- 62- Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L. (2008).** Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), 436–447.
- 63- Kurt B. Z., OztenKandas N., Dag A., Sonmez F., Kucukislamoglu M. (2017).** Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-chalcone derivatives containing urea moiety as potential anticancer agents. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1120-1129.
- 64- Landsdown R.V. (2014).** *Mentha spicata*. The IUCN Red List of Threatened species. “www.iucnredlist.org”.
- 65- Lange B. M., Rujan T., Martin W., & Croteau R. (2000).** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13172-13177.
- 66- Linné V. C. (2007).** Biological Significance of Alkaloids. *Alkaloids - Secrets of Life*, 141–180.
- 67- Liu R. H. (2003).** Protective role of phytochemicals in whole foods: implications for chronic disease prevention. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*, 1, 39-46.
- 68- Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques et universitaire romande.
- 69- Macheroux P., Schmid J., Amrhein N., Schaller A. (1999).** A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta*, 207(3), 325-34.
- 70- Mahboubi M. (2017).** *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 26, 1-4.
- 71- Mahmoudi S., Khali M et Mahmoudi N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Revue « Nature & Technologie »*, 09,35-40.
- 72- Makhloufi et Makhlouf.(2018).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Mentha spicata*. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Spécialité: Pharmaco-toxicologie, P.32-33.
- 73- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79,727-747.
- 74- Mata A. T., Proença C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F., Araújo M. E. M. (2007).** Antioxidant and anti-acetyl cholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), 778–786.

- 75- Miliauskasa G., Venskutonisa P. R., Van Beekb T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231–237.
- 76- Montagnier L., Olivier R., Pasquier C. (1998).** Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. CRC Press.
- 77- Moon H.K., Hong S.P., Smets E., Huysmans S. (2009).** Micromorphology and character Evolution of Nutlets in Tribe Mentheae (Nepetoideae, Lamiaceae). *Systematic Botany*, 34(4), 760-776.
- 78- Moreno M.G., Reyes G. (2014).** The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Revista de Gastroenterología de México*, 795(2), 135-144.
- 79- Morel Y., Mermod N., Barouki R. (1999).** An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6825-6832.
- 80- Mueller-Harvey I. (2001).** Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, 91, 3–20.
- 81- Mueller-Harvey I., McAllan A. B. (1992).** Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, 1, 151-217.
- 82- Muniz M.N. (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier GRENOBLE I, Discipline : CHIMIE, P. 20-28.
- 83- Muriel P. (2009).** Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology international*, 3(4), 526-536.
- 84- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013).** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- 85- Newman J. D., Chappell J. (1999).** Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 34(2), 95-106.
- 86- Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. (2008).** Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian journal of pharmaceutical research IJPR*, 7 (3), 203–209.
- 87- Okuda T., Ito H. (2011).** Tannins of constant structure in medicinal and food plants- hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217.
- 88- OMS. (2002).** Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments. Médecine traditionnelle: Besoins croissants et potentiel. Genève.

- 89- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction: oxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307–315.
- 90- Padmini E., Prema K., VijayaGeetha B., Usha Rani M. (2008).** Comparative study on composition and antioxidant properties of mint and black tea extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1887–1895.
- 91- Paduch R., Kandefler-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. (2007).** Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 55(5), 315-327.
- 92- Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M. (2008).** Investigation of the antioxidant behavior of air- and freeze-dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5743–5752.
- 93- Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C. (2008).** Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89-96.
- 94- Poli G., Albano E., Dianzani M.U. (Eds.). (1993).** Free radicals: from basic science to medicine, Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland, 365-373.
- 95- Poumale H. M. P., Hamm R., Zang Y., Shiono Y., Kuete V. (2013).** Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*, 261–300.
- 96- Pousset J. L. (1989).** *Plantes médicinales africaines*. Paris: Ellipses.
- 97- Prakash O., Chandra M., Pant A. K., Rawat D. S. (2016).** Mint (*Mentha spicata L.*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation. Flavor and Safety*, 561–572.
- 98- Quezel P., Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition de centre national de la recherche scientifique. Paris, 611-1170.
- 99- Raju M., Varakumar S., Lakshminarayana R., Krishnakantha T.P., Baskaran V. (2007).** Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 101(4), 1598–1605.
- 100-Rebbas K., Bounar R., Gharzouli R., Ramdani M., Djellouli Y., Alatou D. (2012).** Plantes d'intérêt médicinale et écologique dans la région d'Ouanougha (M'sila, Algérie). *Phytothérapie*, 10(2), 131–142.
- 101-Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11(6), 419-424.
- 102-Saxena M., Sawena J., Nema R., Singh D., Gupta A. (2013).** Phytochemistry of medicinal plant. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6), 168-182.

- 103-Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- 104-Scherer R., Lemos M. F., Lemos M. F., Martinelli G. C., Martins J D L., Da Silva A. G. (2013).** Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata L.*). *Industrial Crops and Products*, 50, 408–413.
- 105-Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal feed science and technology*, 91(1), 21-40.
- 106-Simic M.G., Bergtold D.S., Karam L.R. (1989).** Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 214(1), 3–12.
- 107-Snoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., De Feo V. (2015).** *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20(8), 14402–14424.
- 108-Sokmen A., Gulluce M., Akpulat A.H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., et al. (2004).** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15(8), 627–634.
- 109-Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart M .E. (2013).** Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376-390.
- 110-Srikrishna D., Godugu C., Dubey P. K. (2018).** Review on Pharmacological Properties of Coumarins. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(2), 113-141.
- 111-Sun B., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- 112-Trease G. E., Evans W. C. (1989).** *Pharmacognosy* (13th edn). Bailliere Tindall, London, 176-180.
- 113-Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- 114-Vergely C., Rochette L. (2005).** Le stress oxydatif Les radicaux libres, des composés à fonction biologique méconnue : à côté de leur action physiopathologique, ce sont des régulateurs avant d'être des destructeurs. *Archives Des Maladies Du Cœur et Des Vaisseaux - Pratique*, 2005(141), 28–30.
- 115-Vermerris W., Nicholson R. (2006).** Isolation and Identification of Phenolic Compounds. *Phenolic Compound Biochemistry*, 151-196.

116-Zhao N., Wang G., Norris A., Chen X., Chen F. (2013). Studying Plant Secondary Metabolism in the Age of Genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(6), 369–382.