



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire قسم: الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité: *Biochimie appliquée*

Intitulé

**Evaluation des activités biologiques des extraits d'une plante
algérienne appartenant au genre *Mentha***

Présenté et soutenu par : SAADOUN Sara Racha

Le : 02/07/2018

SAIFI Ines

ZIANE Maroua

Jury d'évaluation :

Président du jury: MAAMERI Z. (Maitre de conférences B-UFM Constantine1)

Rapporteur: SEMRA I. (Maitre assistante A - UFM Constantine1)

Examineur: MADI A. (Maitre de conférences B- UFM Constantine1)

**Année universitaire
2017 - 2018**

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, la première personne que nous tenons à remercier est notre encadreur **M^{me} Semra Ilhem** pour ses orientations, sa confiance, sa patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. Qu'elle trouve dans ce travail notre profonde gratitude et un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions en commençant à remercier **M^{me} Maameri** Maitre de conférences A à l'université Constantine 1, d'avoir accepté de présider notre jury. Nous remercions également **M^{me} Madi** Maitre de conférences B à l'université Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à **M^{lle} Mounia Fergueni**, responsable du laboratoire 14 de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université constantine1- de nous avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions que soient. Et à **M^r Chawki Bensouici** pour nous avoir accueillie au sein du laboratoire de la biochimie au niveau du Centre de Recherche de Biotechnologie -Constantine- .

Nous remercions aussi **M^{me} Leila Khebbeb** qui nous a aidé lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études, en particulier **M^r Bensegueni** et **M^r Chikhi**.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à l'exécution de ce travail.

Dédicaces

A mes parents qui ont toujours été là pour m'aider et soutenir

A mes frères AYMEN et LOUAI et ma sœur AMANI

A toute ma famille

A mes amis et mes collègues

Je dédie ce travail

Sara Racha

Dédicaces

A mes parents qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui

A ma grand-mère qui m'a toujours aidé et soutenu

A ma sœur FERYEL et mon frère MOHAMED CHAKIB

A toute ma famille

A mes amis et mes collègues

Je dédie ce travail

Ines

Dédicaces

A mes parents qui m'ont toujours aidé

A ma sœur KHAOULA et mon frère SOFIANE

A mes amies ADAMS, MAROUA, RADJA et KHOULOU

A mes collègues

Je dédie ce travail

Meroua

Sommaire

Introduction

Aperçu bibliographique sur le genre *Mentha*

1. Généralité sur les lamiacées.....	1
1.1. Description et caractéristiques botanique de la famille des <i>Lamiaceae</i>	2
1.2. Classification des lamiacées.....	3
1.3. Distribution géographique des lamiacées.....	4
1.4. Utilisation.....	5
2. Présentation du genre <i>Mentha</i>	5
2.1. Aspects botanique du genre <i>Mentha</i>	6
2.2. Classification des menthes.....	7
2.3. Distribution géographique des menthes.....	7
2.4. Domaine d'utilisation du genre <i>Mentha</i>	8
2.4.1. En médecine traditionnelle et dans la pratique actuelle.....	8
2.4.2. Utilisation culinaire.....	9

Métabolites secondaires

1. Généralité sur les métabolites secondaires.....	10
1.1. Composés phénoliques.....	10
1.1.1. Principes voies de biosynthèse des polyphénols.....	11
1.1.1.1. Voie shikimate.....	11
1.1.1.2. Voie acétate-malonate.....	13
1.1.2. Dosage des polyphénols.....	13
1.1.3. Phénylpropanoïdes.....	14
1.1.4. Flavonoïdes.....	14
1.1.4.1. Structure chimique et classification.....	14
1.1.4.2. Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	16
1.1.4.3. Dosage des flavonoïdes.....	17
1.1.4.4. Flavonoïdes comme antioxydants.....	18
1.2. Huiles essentielles.....	18
1.3. Métabolites secondaires isolés à partir du genre <i>Mentha</i>	19

Activités biologiques

1. Activité antioxydante.....	21
1.1. Stress oxydatif.....	21
1.2. Radicaux libres.....	21
1.2.1. Espèces réactives d'oxygène.....	23
1.2.2. Rôle des radicaux libres.....	24
1.2.3. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme.....	25
1.3. Classification des antioxydants.....	25

1.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants.....	27
1.3.2. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante.....	29
1.3.2.1. Test du 2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl (DPPH).....	30
1.3.2.2. Test de décoloration de radical cation ABTS.....	31
1.3.2.3. Test de réduction du cuivre (CUPRAC).....	32
2. Activité anticholinestérase.....	33
3. Activité antimicrobienne.....	35
3.1. Activité antibactérienne.....	35
3.2. Activité antifongique.....	

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	36
2. Caractérisation quantitative des extraits.....	36
2.1. Dosage des polyphénols.....	36
2.2. Dosage des flavonoïdes.....	37
3. Activités biologiques <i>in vitro</i> des extraits.....	37
3.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	38
3.1.1. Test par capture du radical DPPH.....	38
3.1.2. Test par piégeage du radical ABTS.....	39
3.1.3. Test par réduction de cuivre (CUPRAC).....	39
3.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase.....	40
3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	40

Résultats et discussions

1. Dosage de polyphénols totaux des extraits de la plante <i>Mentha</i>	44
2. Dosage de flavonoïdes totaux des extraits de la plante <i>Mentha</i>	47
3. Activité antioxydante.....	49
3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	49
3.2. Test à l'ABTS.....	53
3.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction de cuivre (CUPRAC).....	57
4. Activité anticholinestérase.....	60
5. Activité antimicrobienne.....	61
5.1. Activité antibactérienne.....	62
5.1.1. Test de la sensibilité des bactéries aux extraits testés.....	62
5.2. Activité antifongique.....	65
5.2.1. Test de la sensibilité des souches fongiques aux extraits testés.....	65
5.2.2. Relation concentration-activité antifongique des extraits.....	67
Conclusion.....	69
Références bibliographiques.....	71

Liste des tableaux

Tableau 01: Position systématique des lamiacées selon l'APG II.....	4
Tableau 02: Classification du genre <i>Mentha</i> selon l'APG II.....	7
Tableau 03: Différents classes des flavonoïdes.....	15
Tableau 04: Principaux métabolites secondaires isolés à partir de différentes espèces du genre <i>Mentha</i>	20
Tableau 05: Présentation des espèces oxygénées réactives.....	23
Tableau 06: Série de dilutions avec les concentrations respectives des extraits.....	39
Tableau 07: souches microbiennes testées.....	42
Tableau 08: Taux des composés phénoliques des extraits de la plante <i>Mentha</i>	45
Tableau 09: Taux des flavonoïdes des extraits de la plante <i>Mentha</i>	48
Tableau 10: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon les différentes concentrations effectuées des extraits.....	50
Tableau 11: Valeurs d'IC ₅₀ des extraits et standards.....	52
Tableau 12: Pourcentages d'inhibition de l'ABTS selon les concentrations des deux extraits....	54
Tableau 13: Valeurs des IC ₅₀ des extraits de <i>Mentha</i> et les standards utilisés.....	56
Tableau 14: Valeurs des absorbances en fonction de la concentration des deux extraits éthanolique et chloroformique.....	58

Tableau 15: Pourcentages d'inhibition négatifs de l'acétylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.....61

Tableau 16: Résultats du test antibactérien de l'extrait chloroformique et éthanolique.....63

Tableau 17: Activité antifongique de l'extrait éthanolique et chloroformique sur les têtées.....67

Liste des figures

Figure 01: Plante de la famille des lamiacées.....	3
Figure 02: Carte de répartition géographique de la famille des lamiacées.....	4
Figure 03: Cinq espèces les plus répandues du genre <i>Mentha</i>	6
Figure 04: Aire de la répartition de la menthe par le monde.....	8
Figure 05: Sentier shikimique menant à la synthèse des principales classes des composés phénoliques.....	12
Figure 06: Structure de base des flavonoïdes.....	15
Figure 07: Voie mixte de la biosynthèse des flavonoides shikimate-malonate.....	17
Figure 08: Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène.....	22
Figure 09: Structures chimiques de BHA et BHT.....	27
Figure 10: Réaction enzymatique de piégeage des ERO.....	28
Figure 11: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.....	30
Figure 12: Oxydation de l'ABTS avec K ₂ S ₂ O ₈ et sa génération.....	31
Figure 13: Réduction du complexe chromogène de Cu ²⁺ -Nc.....	32
Figure 14: Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's.....	34
Figure 15: Illustration de dosage des polyphénols totaux (a) des extraits et les valeurs d'absorbance (b).....	44
Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux DO=f (concentration).....	45
Figure 17: Quantité de composés phénoliques des extraits de la plante <i>Mentha</i>	46

Figure 18: Illustration de dosage des flavonoides totaux (a) des extraits et les valeurs d'absorbances (b).....	47
Figure 19: Courbe d'étalonnage de la quercitine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	48
Figure 20: Quantité de flavonoïdes totaux des extraits de la plante <i>Mentha</i>	48
Figure 21: illustration de la réaction colorimétrique (a) du test DPPH des extraits et les valeurs d'absorbances (b).....	50
Figure 22: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique.....	51
Figure 23: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique.....	51
Figure 24: Comparaison des valeurs d'IC ₅₀ des extraits de la plante et les standards Utilisés.....	52
Figure 25: Illustration de la réaction (a) du test ABTS et les valeurs d'absorbances (b).....	54
Figure 26: Pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique.....	55
Figure 27: Pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique.....	55
Figure 28: Histogramme représentant les valeurs des IC ₅₀ des extraits de <i>Mentha</i> et standards utilisés.....	56
Figure 29: Illustration de la réaction colorimétrique (a) du test CUPRAC des extraits et les valeurs d'absorbances (b).....	58
Figure 30: Absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration de l'extrait Ethanolique.....	59
Figure 31: Absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique.....	59

Figure 32: Illustration de la réaction colorimétrique et les absorbances en t=0 (a) et en t=15 min (b) de l'activité anti-cholinestérase.....	60
Figure 33: Illustration des résultats du test de diffusion en milieu gélosé des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait chloroformique.....	62
Figure 34: Illustration des résultats du test de diffusion en milieu gélosé des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanolique.....	62
Figure 35: Zones d'inhibitions en mm des quatre souches bactériennes testées en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique.....	64
Figure 36: Illustration du test antifongique de l'extrait chloroformique.....	65
Figure 37: Illustration du test antifongique de l'extrait éthanolique.....	65
Figure 38: Zones d'inhibitions en mm des souches fongiques en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique.....	67
Figure 39: Diamètres d'inhibition des souches testées en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique.....	68

Liste des abréviations

A

A_{0,50} : Absorbance à concentration 0,50.

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

Ach : Acétylcholine.

AchE : Acétylcholinestérase.

AchEI : Acétylcholinestérase inhibiteur.

AChI : Acétylthiocholine iodure.

AC-NH₄ : Acétate d'ammonium.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Al(NO₃)₃, 9H₂O : Nitrate d'aluminium.

Al³⁺ : Ions d'aluminium.

APG : Angiosperm phylogeny group.

ArO• : Oxydant.

ArOH et **RH** : Antioxydant.

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine triphosphate.

B

B : *Bacillus subtilis*.

BchE : Butyrylcholinestérase.

BchEI : Butyrylcholinestérase inhibiteur.

BHA : butyl-hydroxy-anisole.

BHT : butyl-hydroxy-toluène.

BL : Blanc.

C

C : Acide ascorbique.

C : Carbone.

CA : *Candida albicans*.

CH₃COOK : Potassium acétate.

ClO⁻ : Hypochlorite.

cm : Centimètre.

Cu Cl₂, 2H₂O : Chlorure de cuivre (II).

Cu(II)-Nc : Cuivre (II)-Néocuproïne.

CUPRAC : Cupric Réducing Antioxidant Capacity.

D

D : Diamètre.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité optique.

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl. DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoïque].

E

é : électron.

E : Tochophérol.

E. Coli : *Escherichia coli*.

ERO : espèces réactives oxygénées.

ET : Transfert d'électron.

EtOH : Ethanol.

F

FCR : Folin-Ciocalteu reactif (réactif de Folin-Ciocalteu).

Fe : Fer.

G

g : Gramme.

GN : Gélose nutritive.

GsH-Px : Glutathion peroxydase.

H

h : Heur.

H⁺ : Hydrogène.

H₂O : Eau distillée.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

I

I % : Pourcentage d'inhibition.

IC : Concentration.

IC₅₀ : Inhibition concentration (Concentration inhibitrice à 50%).

K

K : *Klebsiella Pneumoniac*.

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium.

L

LDL : lipoprotéine de basse densité.

LPS : Lipopolysaccharide.

M

M : Molarité.

MA : Maladie Alzheimer.

MC : Mentha chloroformique.

ME : Mentha éthanolique.

MeOH : Méthanol.

MH : Muller-Hinton.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

N

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

Na₂HPO₄ ,2H₂O : Hydrogénophosphate de sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NaH₂PO₄ ,2H₂O : Dihydrogénophosphate de sodium.

NaHCO₃: Bicarbonate de sodium.

NaOH : Soude.

nm : Nanomètre.

O

O• : Radical libre d'oxygène.

O₂ : Oxygène.

O₂•⁻ : Radical superoxyde.

OH : Hydroxyle.

OH• : Radical hydroxyle.

P

PAL : Phénylalanine-ammonia-lyase.

PEP : Phosphoenolpyruvate.

pH : Potentiel d'hydrogène.

Phe : Phénylalanine.

Q

Q : Ubiquinone.

R

R² : Coefficient de corrélation.

R• : Radical libre.

RNS : Reactive nitrogen species (Espèces réactives d'azote).

S

S : Solution.

SA : *Streptococcus aureus*.

SC : *Saccharomyces cerevisiae*.

S_m : Solution mère.

SNC : Système nerveux central.

SOD : Superoxyde dismutase.

T

TBHQ : Tertio-butylhydroquinone.

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity.

TFC : Total flavonoid content (teneur en flavonoïdes totaux).

TPC : Total phenolic content (teneur en polyphénols totaux).

Trolox : Acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetraméthylchroma-2-carboxylique.

U

UV : Ultra-violet.

V

V : Volume.

μ

μg EAG/mg : Microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait sec.

μg EQ/mg : Microgramme d'équivalent de La quercitine par milligramme d'extrait sec.

μg/ml : Microgramme par millilitre.

μl : Microlitre.

μm : Micromètre.

λ_{\max} : Longueur d'onde maximale.

% : Pourcent et Pourcentage.

> : Supérieur.

± : Plus ou moins.

° C : Degré celcius.

α : alpha.

Introduction

Introduction

Dés l'aube de l'humanité, la plante est utilisée comme aliment, médicament, poison ou matériau. Mais, pendant longtemps, cette utilisation a lieu sans que l'on connaisse les spécificités biologiques des plantes et sans faire la distinction entre plante comestible et plante toxique (Magnin-Gonze 2015). Cependant, l'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir des plantes aromatiques et médicinales n'a augmenté que durant ces dernières années dans le but de chercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine (ghazghazi et al. 2013).

En effet, on appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétologie et pour l'aromatisation culinaire. Elles font partie de notre quotidien sans que nous le sachions. Il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action de ces plantes, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués aux métabolites secondaires tel que les polyphénols et flavonoïdes (El amri et al. 2014; ghazghazi et al. 2013).

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier.

Dans ce contexte, la famille des *Lamiceae* constitue une source très importante de plantes qui ont des effets antibactériens naturels, antioxydants, antifongiques et antitumoraux, ce qui suggère que ses membres peuvent être viables alternatives aux produits synthétiques dans la thérapie de diverses maladies. Ainsi, les bienfaits prouvés pour la santé représentent la raison principale pour laquelle plusieurs plantes médicinales appartenant à cette famille sont de plus en plus exploités de nos jours, dans diverses formulations. Ces approches ont révélé non seulement des effets thérapeutiques similaires aux molécules chimiques de synthèse, mais aussi elles n'ont pas produit des effets secondaires et peuvent donc être utilisées sur de longues périodes (Cocan et al. 2017).

Au sein de la famille des Lamiacées, le genre *Mentha* représente l'un des principaux genres (Brahmi et al. 2016). Les espèces de *Mentha* occupent une place privilégiée dans la phytothérapie. Elles étaient cultivées depuis l'antiquité pour leurs propriétés médicinales, ce qui nous a mené dans la présente étude à évaluer quelques activités biologiques d'un extrait ethanologique et un extrait chloroformique d'une plante appartenant à ce genre.

Notre travail sera donc réparti en deux grandes parties:

La première partie, consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle on présente un aperçu sur le genre *Mentha*, les différents métabolites secondaires isolés à partir de ce genre et enfin, les activités biologiques reconnues de ce genre.

Le deuxième volet, concerne la partie expérimentale qui renferme en un premier chapitre le matériel et méthodes utilisés et en un deuxième chapitre les résultats et discussions de l'étude des activités biologiques de la plante étudiée.

Le présent travail consistait à évaluer:

- L'activité antimicrobienne: l'activité antibactérienne et l'activité antifongique.
- L'activité antioxydante: en utilisant trois méthodes complémentaires.
- L'activité enzymatique: anticholinestérase.
- La teneur en polyphénols totaux.
- La teneur en flavonoïdes totaux.

A la fin, une conclusion générale viendra achever le présent travail dans laquelle différents perspectives de recherches sont évoqués.

**Revue
bibliographique**

1. Généralité sur les lamiacées

La famille des lamiacées (*Lamiaceae*) est l'une des principales familles des plantes à fleurs connues depuis longtemps à cause des propriétés médicinales, aromatiques ou culinaires des espèces qu'elle renferme, aussi connue sous le nom de famille de la menthe (Pan et al. 2017). La dénomination de *Lamiaceae* provient du genre *Lamium* et correspond au nom latin des *lamiées*, cette famille fut également connue sous le nom des labiées, du latin *Labium* signifiant lèvre, en référence à la forme caractéristique de ses fleurs (Senejoux 2011). Elle a été initialement décrite et nommée par Jussieu 1789 (Brahmi et al. 2017).

Les lamiacées sont le plus souvent des plantes herbacées ou légèrement ligneuses, annuelles ou vivaces aromatiques, des arbustes ou sous-arbrisseaux et rarement des arbres ou des lianes (Martin 2014). Elles constituent une famille de plantes à fleurs avec une distribution cosmopolite contenant environ 236 genres et il a été déclaré contenir 6900 à 7000 espèces (Tamokou 2017). C'est une famille exceptionnellement homogène, une labiée est extrêmement facile à reconnaître (Dupont et Guignard 2012).

Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires principalement les huiles essentiels, les composés phénoliques, les flavonoïdes, les iriodes glycosylées et les terpénoïdes qui sont responsables de l'odeur aromatique de ces plantes (Mamadalieva et al. 2017; Bo et al. 2016), susceptibles d'être utilisés dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

1.1. Description et caractéristiques botaniques de la famille des *Lamiaceae*

La détermination botanique de cette famille est souvent délicate en raison de la variabilité extrême de ses espèces qui peuvent être soit herbacées odorantes, annuelles ou vivaces, soit des sous-arbrisseaux à poils glanduleux aromatiques, très rarement des arbres (Martin 2014) ayant la consistance et la couleur de l'herbe. Elle constitue l'une des plus grandes familles d'angiospermes les plus répandues dans le règne végétal (Bo et al. 2016).

Chez les espèces de cette famille (Figure 01), les caractères morphologiques et caractéristiques sont notés:

a. Appareil végétatif

- Ce sont des herbes à tiges souvent quadrangulaires (section carrée) se multipliant, en une même saison, à l'aide de rejets aériens (stolon) ou rhizomateux, généralement ligneuses à leurs base et très ramifiées (Dupont et Guignard 2012).
- **Les feuilles** émergent à l'opposé, chaque paire perpendiculaire à la précédente (décussée) ou verticillée (Ramasubranania 2012) pétiolées dépourvues de stipules (Dupont et Guignard 2012).

Ce sont des plantes à essences dont l'odeur se dégage par simple attouchement des feuilles ou des tiges. En effet, les huiles essentielles des labiées se forment dans les poils à essence et se localisent à l'extérieur sous la cuticule qui se soulève (Dupont et Guignard 2012).

b. Appareil reproducteur

- **Les inflorescences:** sont fréquemment condensées en glomérule et souvent stimulent autour de la tige un verticille de fleurs (Dupont et Guignard 2012).
- **Les fleurs:** typiquement zygomorphes à deux lèvres (rarement à une), parfois à symétrie radiaire, hermaphrodites ou mâles-stériles (Martin 2014; kokkini et *al.* 2003):
 - **Le calice:** est un pentamère à pièces souvent soudées (parfois bilabié), généralement terminées par des dents supplémentaires ou des aiguillons (Martin 2014).
 - **La corolle:** est nettement bilabiée, d'où le nom de la famille: constituée de pétales soudés entre eux qui forme deux lèvres, l'une est formée des deux pétales supérieurs, l'autre des trois pétales inférieurs (Dupont et Guignard 2012).
 - **L'androcée:** possède quatre étamines rarement réduites à deux insérées sur le tube de la corolle (Kokkini et *al.* 2003).
 - **Le gynécée:** (ovaire) possède deux carpelles soudés et subdivisent chacun par une fausse cloison en deux demi loges, chacune contenant un ovule (Dupont et Guignard 2012).
- **Le fruit:** est un tétrakène (forment de quatre nucules) (Martin, 2014) logé au fond d'un calice persistant (Dupont et Guignard 2012).



Figure 01: Plante de la famille des lamiacées (Ducerf 2014).

1.2. Classification des lamiacées

La classification de la majorité des sous-familles a été faite par Bentham en 1876 et la révision a été présentée par Briquet en 1895. Cependant, les rapports récents de la biologie moléculaire et le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont proposé en 1998 une nouvelle classification ordinale des plantes (APG. 1998). Cette classification révisée en 2002 (APG. 2002) est montrée dans le tableau 01:

Tableau 01: Position systématique des lamiacées selon l'APG II (APG. II; Bray 2005)

Embranchement	Spermatophytæ (Plante à graines)
Sous-embranchement	Angiospermae (graines protégées) ou plantes à fleurs
Classe	Dicotylédonae (Eudicots) ou dicotylédone vrai
Sous-classe	Asteropsysdae
Groupe	Eustérideae
Superordre	Lamianeae
Ordre	Lamiale
Famille	<i>Lamiaceae</i>

1.3. Distribution géographique des lamiacées

La famille des lamiacées a une distribution cosmopolite, de régions tempérées à tropicales, mais se trouve principalement dans le bassin méditerranéen (Brahmi et *al.* 2017). Cependant, elle est absente dans les régions les plus septentrionales, ce sont des plantes des milieux ouverts, avec de rares espèces en forêt tropicale humide (Martin 2014) (Figure 02).

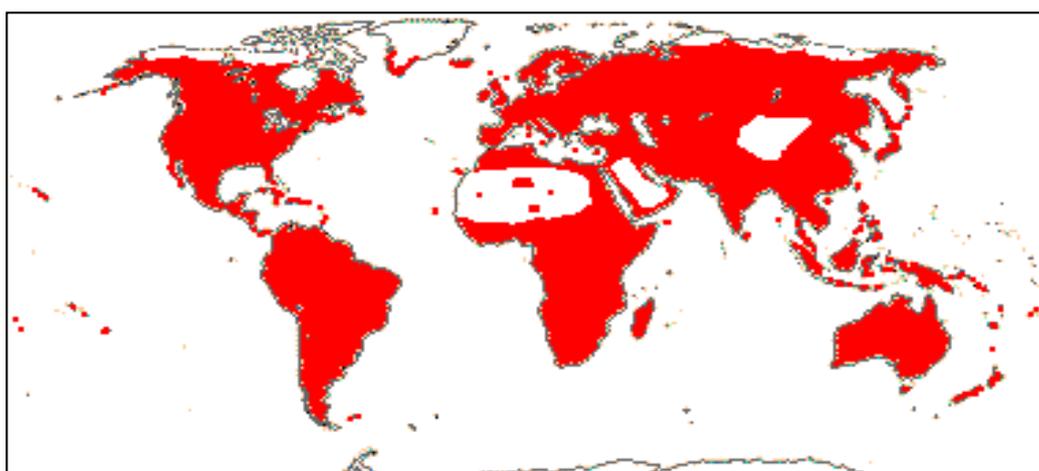


Figure 02: Carte de répartition géographique de la famille des lamiacées (en rouge) (Zaabat 2012).

1.4. Utilisation

Il s'agit d'une vaste famille très typiquement du monde végétal et qui possède une importance économique due à la production des nombreux composés phytochimiques. Plusieurs chercheurs ont souligné que les plantes qui appartiennent à la famille des lamiacées sont riches en composants actifs tels que menthone, menthol, acide rosmarinique et carvone (Rameshwar et al. 2012) et en composés polyphénoliques et un grand nombre d'entre eux sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, antifongiques, anti-tuberculoses, anti-tumorales, anti-cholinestérases, anti-leishmanioses, anti-dépressions, antidiabétiques, antispasmodiques, analgésiques, cardioactives...etc. (Bimakr et al. 2011; Rameshwar et al. 2012).

2. Présentation du genre *Mentha*

L'étymologie du mot Menthe a beaucoup été discutée, certains auteurs disent que le nom de la plante est la francisation du latin *Mentha* et les Grecs *Mintha* ou *Minthé*, ce nom provient de celui d'une nymphe de la mythologie grecque qui était la fille du dieu des rivières (Couplan 2012). La menthe tue le fœtus et s'oppose à la reproduction en empêchant la coagulation du sperme (Carlier-Loy 2013).

La plante était déjà connue chez les égyptiens. Au XIIIème et XVIIème siècles, il a été retrouvé des fragments des plantes séchées dans des tombeaux, elle était utilisée pour la conservation des momies, à cause de sa forte odeur. La menthe était utilisée avec le myrte et romarin durant la cérémonie funéraire afin de masquer l'odeur des cadavres. Le terme de *Mentha* apparaît en 1275 dans la littérature française (Carlier-Loy 2015).

Une partie importante des plantes utiles qui ont été connues depuis le passé et n'ont jamais perdu leur importance à ce jour sont les plantes trouvées dans la famille des lamiacées. Les menthes forment un genre *Mentha*, appartenant à la famille des lamiacées ou labiacées réparti en huit sous famille. Presque la moitié des Lamiaceae sont regroupées dans la sous famille des *Nepetoideae*. Au sein de cette dernière, le genre *Mentha* est représenté par environ 42 espèces (Bahadori et al. 2018) et 13 hybrides (Mamadaliyeva et al. 2017), c'est une plante herbacée vivace, dicotylédone et gamopétale, susceptible de se reproduire par des rhizomes,

par marcottage ou par bouturage (Sutour 2010). Ci-dessous, on présente les cinq espèces les plus répandues du genre *Mentha* (Figure 03).

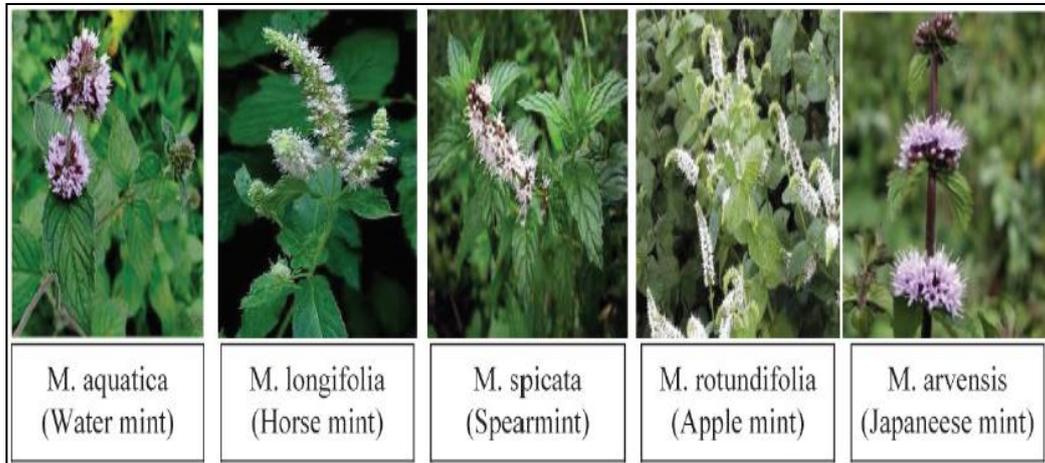


Figure 03: Cinq espèces les plus répandues du genre *Mentha* (Brahmi et al. 2017).

2.1.Aspects botanique du genre *Mentha*

Selon Briquet, le genre *Mentha* possède un appareil végétatif vivace généralement dressé (Gilly 2005). A l'aisselle des écailles des stolons, des bourgeons donneront de tige dressée, ramifiée et carrée munie de quatre colonnes de collenchyme placé dans les ongles qu'il y a près d'un endoderme et de cristaux d'oxalate de calcium quadratique, tubulaire ou en bâtonnets dans des cellules de la moelle. Les feuilles sont généralement disposées en paires opposées et dentées, montrant également une grande diversité de couleurs, très odoriférantes (Pereira et al. 2013).

L'appareil reproducteur des menthes se caractérisent par une combinaison de caractères:

- **Les fleurs:** blanches à violettes pales (Pereira et al. 2013), en épis cylindrique, en tête sphérique terminale (Quezel et Santa 1962).
 - **Calice:** est actinomorphe ou sous-bilabial, tubulaire ou campanulé; la plante est 10-13 vasculaire.
 - **Corolle:** faiblement à deux lèvres, le lobe supérieur est plus large, généralement émarginé et plus court que le tube calice.
 - **Étamines :** elle a quatre étamines et s'élève de dessous de labium vers l'extérieur (Sevindik 2018).

2.2. Classification des menthes

La classification du genre *Mentha* dans le règne végétal selon l'APG II est représentée dans le tableau 02:

Tableau 02: Classification du genre *Mentha* selon l'APG II (APGII. 2002; Bray 2005).

Embranchement	Spermatophytae
Sous-embranchement	Angiospermae ou plantes à fleurs
Classe	Dicotylédonae ou dicotylédone vrai
Sous-classe	Dicotylédonae ou dicotylédone vrai
Groupe	Eustériideae
Superordre	Lamianeae
Ordre	Lamiale
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Mentha</i>

2.3. Distribution géographique des menthes

La culture de cette plante se pratique principalement dans les régions humides, et subtropicales d'Europe et d'Asie, mais aussi en Afrique du Sud, en Australie et aux États-Unis. Elle est aujourd'hui retrouvée partout dans le monde, d'ailleurs elle est parfois considérée très envahissante (Deschamps et *al.* 2008; Cirlini et *al.* 2016) (Figure 04).

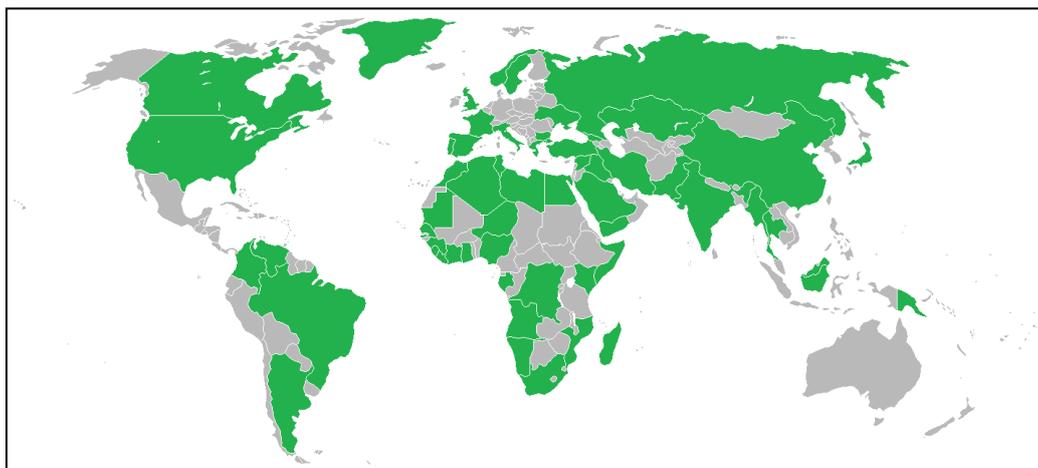


Figure 04: Aire de la répartition de la menthe par le monde (en vert) (Carlier-Loy 2015).

Cette répartition fait de la menthe, aujourd’hui la plante probablement la plus répandue et la plus célèbre de nos plantes médicinales et aromatiques.

2.4. Domaine d’utilisation du genre *Mentha*

2.4.1. En médecine traditionnelle et dans la pratique actuelle

Les espèces du genre *Mentha* sont universellement appliquées en médecine populaire. Elles agissent comme stomachiques, toniques, stimulant digestif, analgésiques, diurétiques, sudorifiques, carminatives, antispasmodiques, anesthésiques et antiseptiques. Sous leur influence, l’activité de l’estomac et l’énergie du cœur et des nerfs se trouvent accrues, en même temps que s’affaiblit l’irritabilité réflexe et la sensibilité à la douleur.

Dans la pratique actuelle, la Menthe s’emploie avant tout contre les troubles digestifs: maux et crampes d’estomac, mauvaises digestions, coliques, nausées, vomissements nerveux,...etc. En second lieu, elle rend d’éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses, insomnie, migraine, spasmes vésicaux et utérins, névroses abdominales, fièvre périodique avec symptômes nerveux,...etc. comme antiseptique et désinfectant, elle se recommande contre les auto-intoxications d’origine intestinale. Par son action sur les muqueuses, bronchiques, elle favorise l’expectoration et rend de bons services contre la toux spasmodique, l’asthme, la coqueluche et l’enrouement (Fournier 2010).

2.4.2. Utilisation culinaire

Plusieurs espèces du genre *Mentha* ont des propriétés culinaires. Les feuilles sont utilisées dans la préparation des aliments ou comme condiment dans diverses denrées alimentaires, telles que les boissons, les glaces, les bonbons, les chewing-gums et les plats de viande (Krzyzanowska et *al.* 2011). Elles ont un goût particulièrement rafraîchissant grâce à leur teneur en menthol, qui possède en même temps une saveur un peu piquante (Couplan 2012).

1. Généralité sur les métabolites secondaires

Outre les métabolites primaires qui englobe les glucides, lipides, acides aminés et acides nucléiques; les métabolites secondaires qui sont le fruit d'un métabolisme complexe, sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la croissance et au développement de base des plantes, ils sont biosynthétisés en réponse aux contraintes de l'environnement (François et *al.* 2012). Ils jouent un rôle considérable dans la plante. Certains, interviennent pour défendre la plante contre les herbivores et les maladies. D'autres, assurent une protection contre les radiations solaires ou encore facilitent la dispersion du pollen ou des graines (Raven et *al.* 2014). Enfin, ces substances sont impliquées dans la couleur et le goût des aliments.

Les métabolites secondaires sont exclusivement synthétisés chez les végétaux (Heller et *al.* 2011). Ils sont très nombreux et très variés (>100000) mais produits souvent en très faibles quantités (François et *al.* 2012). Les lieux d'accumulation de ces composés dans l'organisme végétal ne sont pas soumis à une règle précise. Suivant les espèces et les diverses catégories de composés, on peut les trouver dans les différents organes ou dans les tissus spécialisés (Merghem 2009). Les métabolites secondaires appartiennent à trois familles de composés:

- Les terpènes ou isopropanoïdes.
- Les composés phénoliques (phenylpropanoïdes, flavonoïdes et les lignines).
- Les hétérosides et les alcaloïdes (François et *al.* 2012).

Les lamiacées sont riches en polyphénols et flavonoïdes.

1.1. Composés phénoliques

Ou polyphenols, sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (Benhamou 2009). Les phénols insolubles sont répartis dans les parois cellulaires, tandis que les composés phénoliques solubles sont compartimentés dans les vacuoles des cellules végétales (Stalikas 2007). Les polyphénols sont largement distribués, comprenant plus de 8000 différentes structures connues (Beserra Almeida et *al.* 2011). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits, les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (Boizot et Charpentier 2006).

Ils ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires. Ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Talbi et al. 2015).

1.1.1. Principes voies de biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols suit généralement deux principales voies synthétiques: la voie shikimate et celle de l'acétate-malonate.

1.1.1.1. Voie shikimate

Les composés phénoliques sont synthétisés principalement par le sentier métabolique shikimique qui existe chez les plantes, les champignons et les bactéries mais pas chez les animaux. Ce sentier conduit à la synthèse de trois acides aminés essentiels: phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Ces derniers sont utilisés comme précurseurs d'un grand nombre de métabolites secondaires. Leur biosynthèse est basée sur l'action de PAL (phénylalanine-ammonia-lyase), l'enzyme clé du sentier shikimique laquelle par désamination, aboutit à la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique (le principale précurseur de la majorité des composés phénoliques) (Benhamou 2009).

La voie du shikimate débute par la condensation d'un érythrose 4-phosphate (prélevé sur la voie des pentoses) et un PEP (Phosphoenolpyruvate) issu de la glycolyse, qui aboutit à la formation d'un composé hétérocyclique à sept carbone, le 3 désoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP), lequel donne naissance à l'acide 5 déshydroquinine qui après une déshydratation conduit à l'acide déshydroshikimique qui est réduit en shikimate à l'aide de NADPH,H⁺, puis après condensation avec une nouvelle molécule de PEP, se forme l'acide préphénique qui par décarboxylation et déshydratation est à l'origine de l'acide phénylpyruvique. L'acide phénylpyruvique à son tour par désamination donne naissance aux deux acides aminés essentiels aromatiques: la tyrosine et la phénylalanine (Benhamou 2009; Mergham 2009; Richter 1993) (Figure 05).

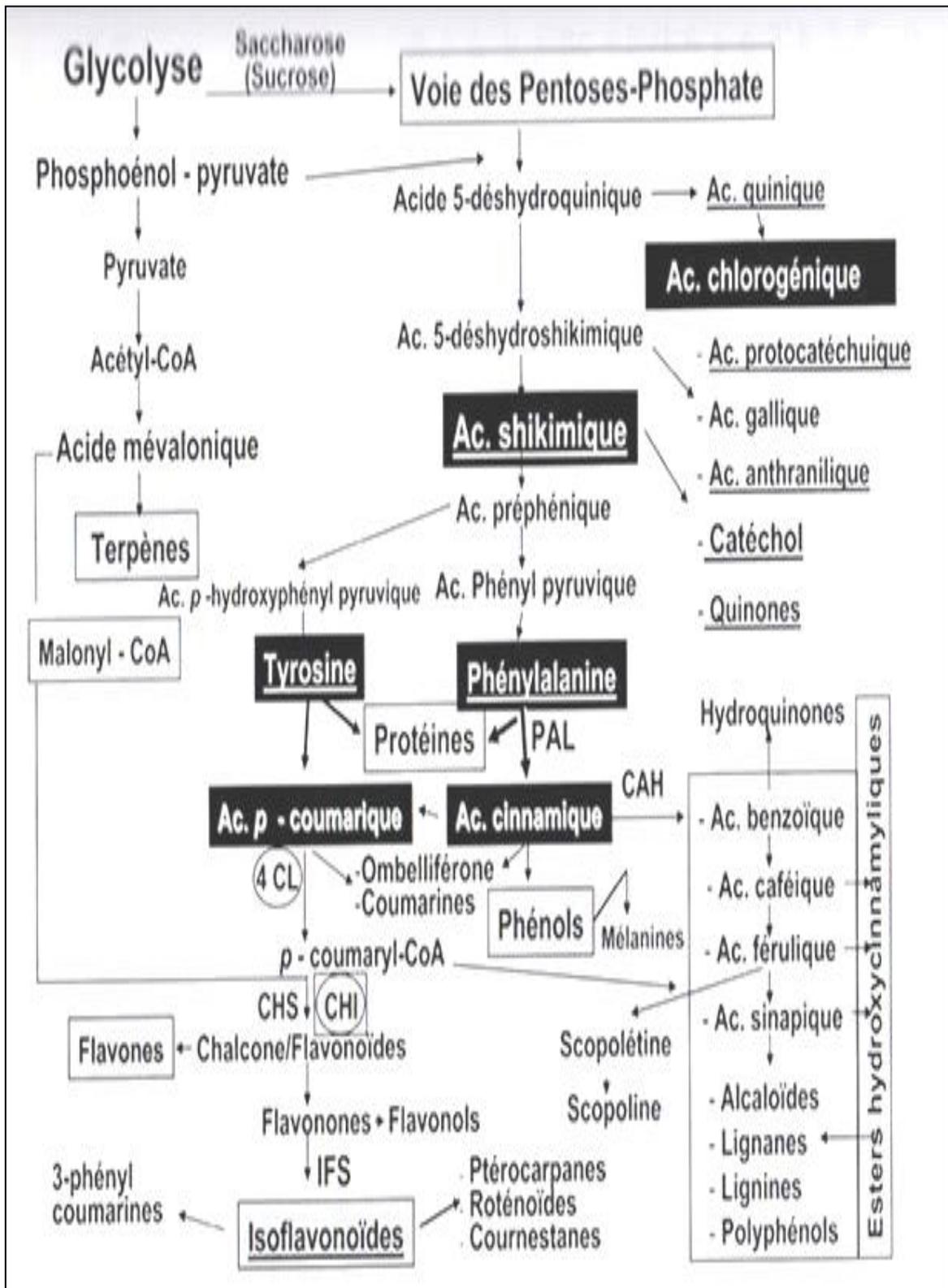


Figure 05: Sentier shikimique menant à la synthèse des principales classes des composés phénoliques (Benhamou 2009).

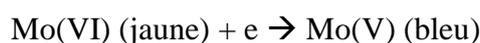
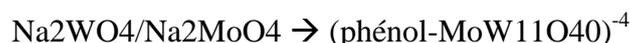
1.1.1.2. Voie acétate-malonate

Ce mode de formation plus secondaire prédomine chez les plantes non verte (Merghem 2009), les systèmes aromatiques sont aussi formés par condensation répétée d'unités acétate. La dénomination voie acétate-malonate, rappelle que le malonyl-CoA fournit par décarboxylation, les unités en C₂ pour allonger le complexe acyl-CoA comme dans la synthèse des acide gras (Richter 1993). Cette voie est utilisée pour la synthèse du noyau aromatique (A) des flavonoïdes (Merghem 2009).

1.1.2. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols est effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu. C'est une méthode analytique biochimique nécessitant la prise d'échantillon, l'extraction des composés phénoliques à partir de ces échantillons puis d'une mesure spectrophotométrique des extraits (Boizot et Charpentier 2006).

Cette méthode développée en 1927 par Folin et Ciocalteu, est basée sur l'utilisation de RFC (réactif de Folin-Ciocalteu). Ce dernier est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (Biozi et Charpentier 2006), le principe de cette réaction se fait comme suit: (Prior et al. 2005).



La couleur produite, dont l'absorbance est comprise entre 725-750 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans les extraits végétaux.

La méthode est simple, sensible et précise. Cependant, la réaction est lente au pH acide et dans ce cas la réduction est peu spécifique pour les fonctions phénols. Singleton et Rossi 1965, ont, ensuite, améliorés cette technique en utilisant un réactif hétéropolyanion molybdotungstophosphorique qui réduit plus spécifiquement les phénols, et λ_{max} du produit est de 765 nm. L'acide gallique est utilisé comme un phénol standard de référence (Prior et al. 2005).

1.1.3. Phénylpropanoïdes

Les acides phénols sont des dérivés de l'acide cinnamique. Ils possèdent un squelette C₆-C₃ de type phénylpropane (Heller et *al.* 2011). Le rôle le plus important des acides phénoliques et leurs dérivés est la capacité de piéger les radicaux par transfert d'électrons avec des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Gonçalves et *al.* 2009).

1.1.4. Flavonoïdes

Sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes, la dénomination historique des flavonoïdes vient du mot latin *flavus* qui signifie jaune (Manach et *al.* 2003), les flavonoïdes sont considérés comme des pigments colorés ou incolores quasiment universels des végétaux interviennent dans la coloration des fleurs, fruits et parfois des feuilles (Bruneton 1999). Il faut rappeler enfin que les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes dans notre alimentation pourraient être liées à un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires et certains cancers, ils sont aussi susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV, ce qui explique une grande part de leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire et des colorants (François 2012).

1.1.4.1. Structure chimique et classification

A l'heure actuelle, plus de 8000 composés à structure de flavonoïdes ont été identifiés (Pon-Velayutham et Dongmin 2009). Les flavonoïdes dérivent de l'acide shikimique, sont structurellement caractérisés par un squelette diphényl propane, formé par deux cycles phényles reliés par un pont linéaire constitué de trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle (C). De ce fait, résulte une structure à trois cycles (A, B et C) formée de 15 carbones (Figure 06). Le squelette de base des flavonoïdes peut présenter divers substituants, les plus fréquents sont les groupes hydroxylés phénoliques (-OH). Ces derniers sont combinés à des sucres pour former des glycosides. Le glucose étant le sucre prédominant, ainsi que d'autres sucres tel que le galactose, rhamnose et le xylose. Ils sont divisés et classés selon le degré d'oxydation du cycle (C) (Santhakumar 2018).

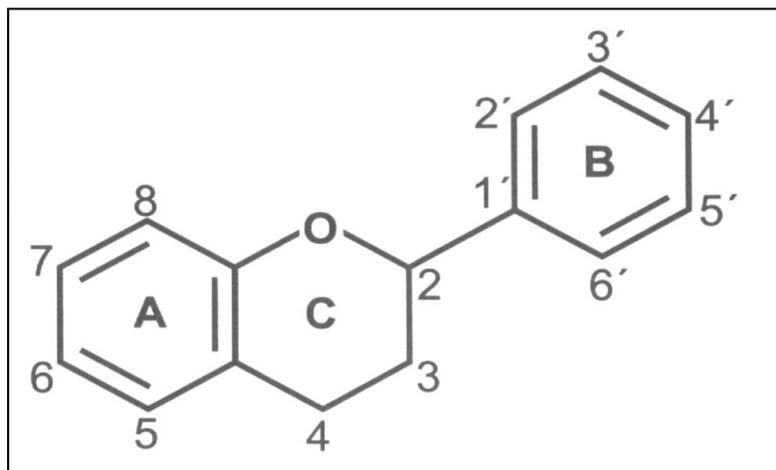


Figure 06: Structure de base des flavonoïdes (Bravo 1998).

Les principales sous-classes sont : les flavones, flavonols, flavanols, flavonones, chalcones et anthocyanidines (Tableau 03).

Tableau 03: Différentes classes des flavonoïdes.

Flavonoïdes	Caractéristiques	Références
Flavones	-Manquent d'oxygénation en C ₃ .	(Santhakumar 2018).
Flavonols	-Un squelette (2-phenyl-1-benzopyrane-4-one). -Une insaturation au niveau des C ₂ et C ₃ du cycle (C), un groupe cétone en C ₄ et un groupe (OH) en position 3 du cycle.	(Bohn 2014; Bravo 1998; Del rio et al. 2013).
Flavanols (catéchines ou flavan-3-ols)	-Pas de double liaison entre les positions 2 et 3.	(Panche et al. 2016).

Flavanones (dihydroflavones)	-Un cycle (C) saturé; la double liaison entre les positions 2 et 3 est saturée.	(Panche et <i>al.</i> 2016).
Chalcones	-Leur structure est dépourvue du cycle (C), les deux cycles (A et B) sont interconnectés par une chaîne tricarbonné.	(Chavan et <i>al.</i> 2016).
Anthocyanes	-Ils sont des glycosides de l'anthocyanidine. -Ne possèdent pas des (-OH) en position 4.	(Santhakumar 2018).

1.1.4.2. Voie de biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se déroule au niveau des chloroplastes à partir de cinnamoyl CoA (provenant de réticulum endoplasmique) (Merghem 2009). Les composés de départ de leur biosynthèse sont la malonyl CoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique (cinnamoyl CoA). La chalcone est un intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec les flavanones, cet équilibre étant contrôlé par isomérase (Richter 1993) (Figure 07).

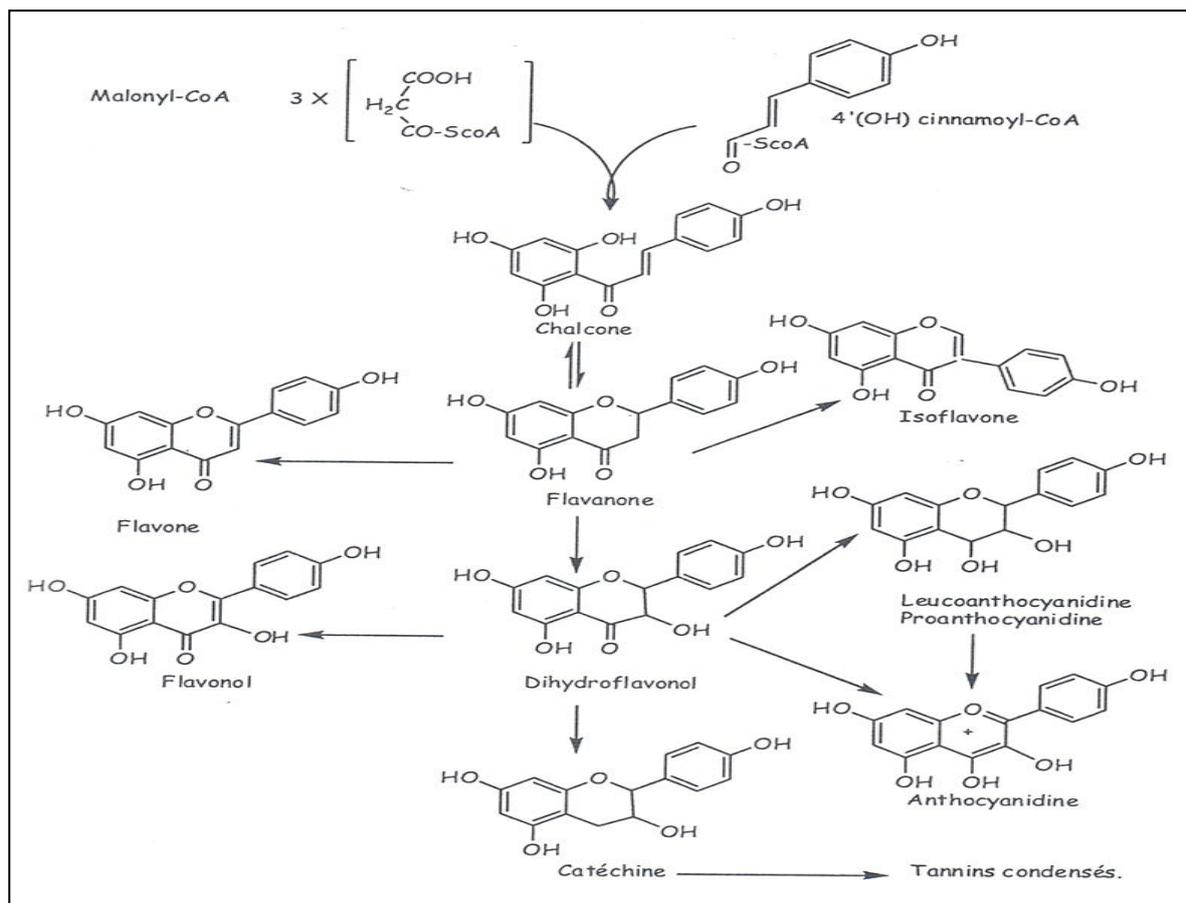


Figure 07: Voie mixte de la biosynthèse des flavonoïdes shikimate-malonate (Merghem 2009).

1.1.4.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Topçu *et al.* 2007, c'est une méthode qui repose sur le principe du dosage direct par le nitrate de l'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).

Le principe chimique de cette méthode colorimétrique est que les ions Al^{3+} de nitrate d'aluminium forment des complexes acides stables de couleur jaune avec le groupe cétone du C_4 et le groupe hydroxyle de C_3 ou C_5 des flavones et des flavonols. Cette méthode est basée sur la nitration du cycle aromatique portant un groupe catéchol (Pękal et Pyrzyńska 2014). L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la teneur des flavonoïdes présente dans l'extrait végétal dont l'absorption maximum 415 nm (Ayoola *et al.* 2008). La quercétine, la rutine,...etc., sont utilisées comme des standards pour établir la courbe d'étalonnage de référence (Chang *et al.* 2002).

1.1.4.4. Flavonoïdes comme antioxydants

La propriété la plus décrite de chaque groupe de flavonoïdes est leur capacité d'agir comme des antioxydants. Les flavones et les catéchines paraissent être les flavonoïdes les plus puissants pour protéger notre organisme contre les EOR.

Les mécanismes de la défense antioxydante du corps incluent les enzymes (la catalase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase), mais aussi les contreparties non-enzymatiques (la glutathion, l'acide ascorbique et le α -tocopherol) (Nijveldt et al. 2001).

Les flavonoïdes, pouvant avoir un effet additif aux composés de piégeage endogènes, ont la capacité d'augmenter la fonction des antioxydants endogènes (Nijveldt et al. 2001). L'arrangement spatial des substituants est, probablement, le plus grand déterminant de l'activité antioxydante. La capacité de piégeage des radicaux libres est attribuée à la haute réactivité dans des substituants hydroxyles (Nijveldt et al. 2001; Heim et al. 2002).



Les flavonoïdes ayant une double liaison C₂-C₃ conjuguée avec le groupe carbonyle en position 4 donnent des valeurs d'IC₅₀ minimales (une forte activité antioxydante). Les aglycones sont des antioxydants plus forts que leurs glycosides correspondant. (Heim et al. 2002).

➤ Autres activités pharmacologiques des flavonoïdes

Plusieurs études effectuées chez les animaux ont montré autres avantages thérapeutiques des flavonoïdes tels que les antiproliférations, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Buer et al. 2010). De plus, ces composés phytochimiques jouent un rôle dans le traitement du diabète en raison de leur capacité de protéger contre les hyperglycémies et dans une vaste cohorte de femme, un essai clinique a montré que les flavonoïdes protègent contre le diabète type II (Masashi 2014).

1.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) des plantes aromatiques en tant qu'importante classe phytochimique ont été reconnus pendant de nombreuses années comme une grande source de produits pharmaceutiques, agents et additifs alimentaires; ils sont constitués principalement d'un mélange de composés volatiles (des terpénoïdes y compris les monoterpènes et séquisterpènes) de faible poids moléculaire (Abdel-hameed et al. 2018).

Les huiles essentielles proviennent du métabolisme secondaire de la plante, normalement formés dans des cellules ou dans les poils glandulaires (Bozovic et *al.* 2015), obtenus à partir des fleurs, des bourgeons, des graines, des feuilles et fruits. Ces composés sont capables de générer de forts arômes (Abdel-hameed et *al.* 2018).

Des études scientifiques ont montré le rôle des huiles essentielles dans les interactions biologiques parmi les plantes et leur potentiel thérapeutique, y compris l'activité anti-inflammatoire, antitumorale, antifongique et aussi comme analgésique (Pandini et *al.* 2018). Il est bien documenté que l'huile essentielle des espèces *Mentha* possède des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Rameshwar et *al.* 2012).

L'évaluation de la composition de 11 espèces du genre *Mentha* en huiles essentielles a montré une prédominance de monoterpènes oxygénés (Del Laet et *al.* 2016).

1.3.Métabolites secondaires isolés à partir du genre *Mentha*

Les métabolites secondaires isolés à partir du genre *Mentha* ont fait l'objet de plusieurs recherches et investigations au cours des années. Les acides phénoliques et les flavonoïdes ont été identifiés comme les principaux composés présents dans différents extraits de Menthe (Gonçalves et *al.* 2009) (Tableau 04).

Tableau 04: Principaux métabolites secondaires isolés à partir de différentes espèces du genre *Mentha* (Brahmi et al. 2017).

Espèces	Composés isolés	Classes
<i>M. longifolia</i>	-acide rosamarinique	Acides phénoliques
	- lutéolin-diglucuronide - lutéolin-glucuronide - methylated-lutéolin-glucuronide	Flavonoides
<i>M. rotundifolia</i>	-acide coumarique -acide rosamarinique -acide caféique	Acides phénoliques
	- Apigénine, Luteoline	Flavonoides
<i>M. pulegium</i>	-Acide cafféique -Acide rosamarinique	Acides phénoliques
	- Apigénine, luteoline, naringénine	Flavonoides
<i>M. piperita</i>	-Acide cinammique -Acide rosamarinique	Acides phénoliques
	- Luteolin 7-O-rutinoside -5,6-Dihydroxy-7,8,3',4' tetraméthoxyflavone - Luteolin 7-O-glucuronide	Flavonoides
<i>M. spicata</i>	- Acide rosamarinique - Acide gallique - Acide caféique	Acides phénoliques
	-Luteoline -Quercétine -Apeginine	Flavonoides

1. Activité antioxydante

Habituellement, l'activité antioxydante est évaluée par la capacité des antioxydants à retarder au maximum l'oxydation. Diverses espèces du genre *Mentha* possèdent un effet antioxydant. Les acides phénoliques, flavones et flavanones sont les principaux composés antioxydants du genre *Mentha*. Aussi, les terpènes oxygénés peuvent contribuer au potentiel antioxydant (Merouane et al. 2014; Brahmi et al. 2017).

1.1. Stress oxydatif

Une partie (1 à 3%) de l'oxygène (O₂) produit au cours de processus de la chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas réduite en molécule d'eau mais convertie en ERO ou radicaux libre (Kovacic et al. 2005). Dans des conditions normales, ces radicaux libres sont physiologiquement en équilibre avec les composés antioxydants (Droge 1999). Dans certaines conditions, au cours d'une inflammation ou en réponse à certains facteurs environnementaux comme les irradiations (UV ou rayons X), les carences nutritionnelles, le tabac, la pollution ou les intoxications aux métaux lourds, la production de ces radicaux libres augmente générant un déséquilibre en faveur des entités oxydantes appelé Stress oxydatif (Favier 2003). Ce déséquilibre peut se définir comme étant un dérèglement entre la production des ERO et le système de défenses antioxydantes. Cette perturbation est un facteur important dans la pathogénèse de nombreuses maladies chroniques tel que: les cancers, diabète, les athéroscléroses, les maladies neurodégénératives, les cirrhoses,....etc. (Bellassoued et al. 2018). Une augmentation du stress oxydatif peut entraîner des destructions tissulaires et provoquer des lésions au niveau des structures cellulaires (Basharat 2015).

Il existe en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture (Favier 2003).

1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres font partie des nombreux métabolites pour plusieurs organismes et un système complexe de sources antioxydantes endogènes et exogènes (Shang et al. 2018). Par définition, un radical libre est toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un

électron libre sur sa couche externe. Cela augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud et *al.* 2006; Maclaren 2007). Ils peuvent être classés en deux catégories: les radicaux primaires et secondaires. Les premiers sont formés directement à partir de l'O₂ appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les seconds sont générés par action d'un radical primaire sur des composés cellulaires tels que les acides nucléiques, les lipides membranaires ou les protéines. La formation des différents radicaux libres à partir de l'O₂ est résumée en (Figure 08).

Le radical hydroxyle OH•, le plus toxique des radicaux libres, est principalement responsable de la réactivité des ERO sur les molécules biologiques. Il est formé par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Valko et *al.* 2007; Gardès-Albert 2003).

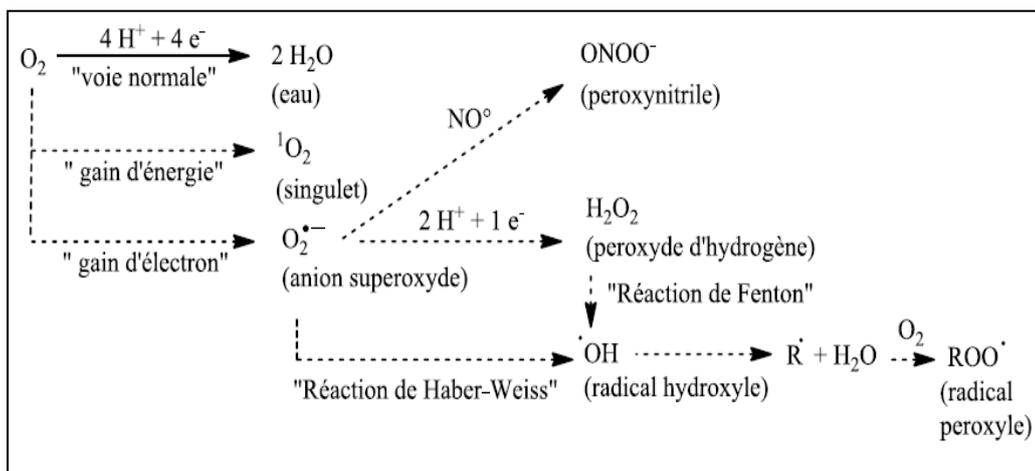
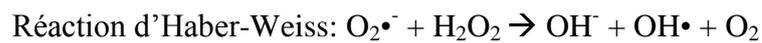
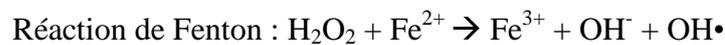


Figure 08: Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène (Gardès-Albert 2003).

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycle redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, les substances nocives inhalées sont également des sources des radicaux libres. Ces derniers sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables (Favier 2003). Les ERO sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils

peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voir indispensables pour les organismes vivants (Valko et *al.* 2004):

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire.
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et les systèmes de défenses, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) (Evans et Halliwell 1999).

Les ERO sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'O₂ est perturbée (stress oxydatif). Ces espèces sont responsables d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides,...etc.) pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires (Gardès-Albert et al. 2003), l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (Favier 2003).

1.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces oxygénées radicalaires et les espèces oxygénées non radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où il se trouve (Tableau 05).

Tableau 05: Présentation des espèces oxygénées réactives (Mohammedi 2013).

Espèces oxygénées réactives radicalaires		
Nomenclature	Structure	Principales réactions
Anion radical superoxyde	$\bullet\text{O}=\text{O}^-$	Catalyseur de la réaction de Haber-Weib par recycle de Fe^{+2} et Cu^+ Formation du peroxyde d'hydrogène et peroxydinitrite.
Radical hydroxyle	$\bullet\text{OH}$	Abstraction de l'hydrogène, production des radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols.
Radical peroxyde	$\text{R}=\text{O}=\text{O}\bullet$	Abstraction de l'hydrogène, production des radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules.
Espèces oxygénées réactives non radicalaires		
Oxygène singlet	$\bullet\text{O}=\text{O}$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides.
Peroxyde d'hydrogène	$\text{HO}=\text{OH}$	Formation du radical hydroxyle, inactivation d'enzymes, oxydation de biomolécules.
Hypochlorite	ClO^-	Oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore.

1.2.2. Rôle des radicaux libres

Chez les plantes, les ERO sont continuellement produites selon le métabolisme aérobie. En fonction de leur nature, certaines, très toxiques, sont rapidement détoxifiées par divers mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Alors que les végétaux génèrent pléthore de processus pour combattre la croissance des ERO produites dans les conditions de stress abiotique, dans d'autres circonstances, ils peuvent tous aussi engendrer délibérément des ERO au titre molécules signales afin de contrôler des nombreux phénomènes comme la défense contre des pathogènes (Stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique (Apel et Hirt 2004).

1.2.3. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants, tels que des mutations de l'ADN, une peroxydation des lipides et une oxydation des protéines. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme accélérant le vieillissement et la dégradation des cellules et des tissus. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production des anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une vague d'attaque chimique (Favier 2003).

1.3. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont des substances chimiques capables de piéger les radicaux libres et retarder ou inhiber l'oxydation des lipides ou d'autres biomolécules et donc d'empêcher ou de réparer les dommages causés aux cellules corporelles par l'oxygène (Shang et al. 2018). Ce sont des molécules capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres (Halliwell 1999).

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physicochimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle: les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et /ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles (Prior et al. 2005).

L'organisme dispose d'un vaste réseau d'antioxydants ou de défense qui ne se limite pas qu'aux seules vitamines C et E. D'une part, une multitude d'antioxydants proprement dits sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par notre alimentation. D'autre part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN (Defraigne et Pincemail 2008).

En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leur structure et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés à piéger les radicaux libres hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) (Bertosz 2003).

a. Antioxydants d'origine végétale (endogènes)

Les plantes constituent une source importante d'antioxydants, ces substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif dû aux effets synergiques ou additifs (Moure et *al.* 2001). Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les plantes supérieures et dans toutes les parties de la plante. Les flavonoïdes constituent la classe la plus étudiée, la propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite et leur capacité à piéger le radical libre: radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes (Ghedira 2005).

Les antioxydants naturels les plus connus étant les acides phénoliques, les caroténoïdes, tocophérols (vitamine E), lignanes et différents autres composés (Dehshahri et *al.* 2012). Le rôle de ces composés naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies cardiovasculaires et inflammatoires (Talbi et *al.* 2015).

b. Antioxydants d'origine synthétique (exogènes)

Afin de réduire le risque de détérioration par oxydation, des antioxydants synthétiques ont été ajoutés à de nombreux produits alimentaires (Barchan et *al.* 2014). Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) qui ont des structures semblables, et leur effet comme antioxydant se ressemble aussi (Figure 09) (Hilton 1989).

BHA et BHT ont été utilisés dans les produits alimentaires, avec certaines restrictions. Le BHT a été initialement développé comme un antioxydant pour une utilisation avec des produits pétroliers et de caoutchouc. Tous les deux sont utilisés comme antioxydants dans un grand nombre d'aliments contenant de l'huile et de graisse. L'utilisation de BHT a diminué

tandis que l'utilisation de BHA a augmenté, c'est principalement parce que BHA est plus stable à des températures élevées. Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (Tertio-butylhydroquinone) qui est un ajout plus récent à la liste des antioxydants autorisés dans les aliments (Race 2009).

L'usage des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remis en raison de l'effet indésirable potentiel tel que la lésion hépatique. Cependant, leur application dans les produits alimentaire a échoué en raison de leur instabilité ou de leur action soupçonnée en tant que promoteurs de cancérogénèse (Msaada 2017; Talbi et al. 2015).

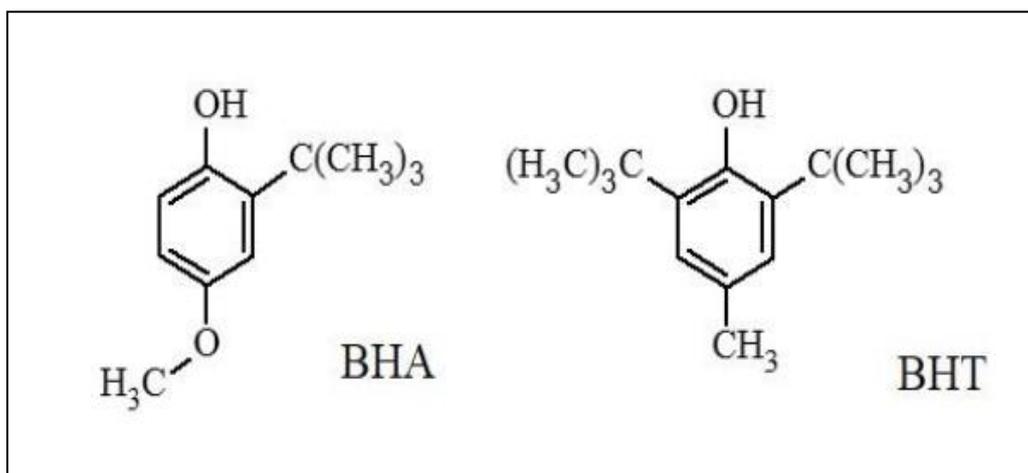


Figure 09: Structures chimiques de BHA et BHT (Jakubczyk et Michalkiewicz 2018).

1.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants

Il est clair que tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes contre les conséquences potentiellement délétères des agents pro-oxydants (Rizzo et al. 2011). Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singlet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ion et de métaux de transition (Favier 2006).

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

a. Système enzymatique antioxydant

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes: le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et *al.* 2001). Ces trois enzymes ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives d'oxygène.

- La SOD catalyse la conversion de deux ions superoxydes et deux protons en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène.
- La catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau, diminuant ainsi sa demi-vie atténuant de ce fait la génération de radicaux hydroxyles. La catalase est liée au NADPH qui protège est améliorée son activité (Ichai et *al.* 2011).
- La GSH-Px catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène (Levrault et *al.* 2003). Elle peut aussi réagir avec d'autres substrats comme les lipides expliquant son rôle protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique. C'est l'une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme (Ichai et *al.* 2011) (Figure 10).

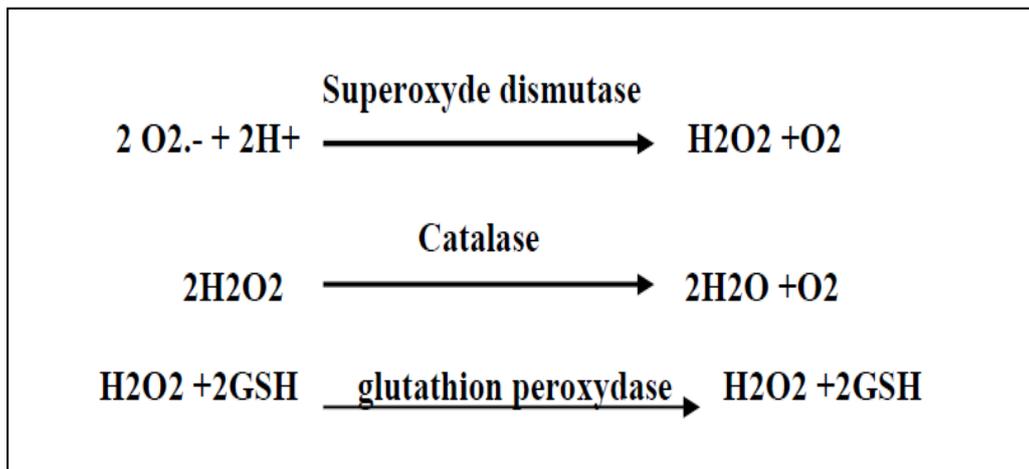


Figure 10: Réaction enzymatique de piégeage des ERO (Halliwell 2006).

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydants comme les peroxyredoxine, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thiorédoxines. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH qui constitue avec la glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier 2003).

b. Système enzymatique antioxydant

Ce système est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska 2002).

Certains composés antioxydants comme la vitamine E (Tocophérol), C (Acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement: les polyphénols, alcaloïdes... etc. Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle, le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• (Favier 2003; Flora 2009).

Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité. Il possède une activité antioxydante propre mais surtout en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase. Une fois oxydé en glutathion disulfure, il est réduit par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le complexe glutathion disulfure/glutathion est le principal responsable thiol de la balance redox intracellulaire (Ichai et *al.* 2011).

1.3.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, plusieurs méthodes de la détermination de l'activité antioxydante ont été proposées. La majorité de ces tests sont basés sur la mesure de la capacité relative des antioxydants à piéger les radicaux libres par transfert d'électron ou de proton (Zaprozhet et *al.* 2004). Les résultats d'activité antioxydante sont, généralement, exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connues sous le nom de Trolox. Seules les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests chimiques *in vitro*, seront représentées ici.

1.3.2.1. Test du 2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl (DPPH)

La méthode utilisée pour la mesure de l'activité anti-radicalaire des extraits des plantes sélectionnées est la méthode de DPPH. Le radical DPPH est l'un des rares radicaux organiques azotés de couleur pourpre foncée, commercialement disponible sous la forme d'un solide; contrairement à l'ABTS⁺, le DPPH ne doit pas être généré avant le test (Prior et al. 2005).

En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH• est réduit par arrachement d'un hydrogène en 2,2' diphényl-1-picrylhydrozyle de couleur jaune (Figure 11). La décoloration de ce radical peut être, facilement, suivie par la mesure de l'absorbance à 515-520 nm (Blois 1958). La réaction entre le DPPH• et un antioxydant se fait comme suit: l'antioxydant donne un hydrogène au radical DPPH (Foti et al. 2008).

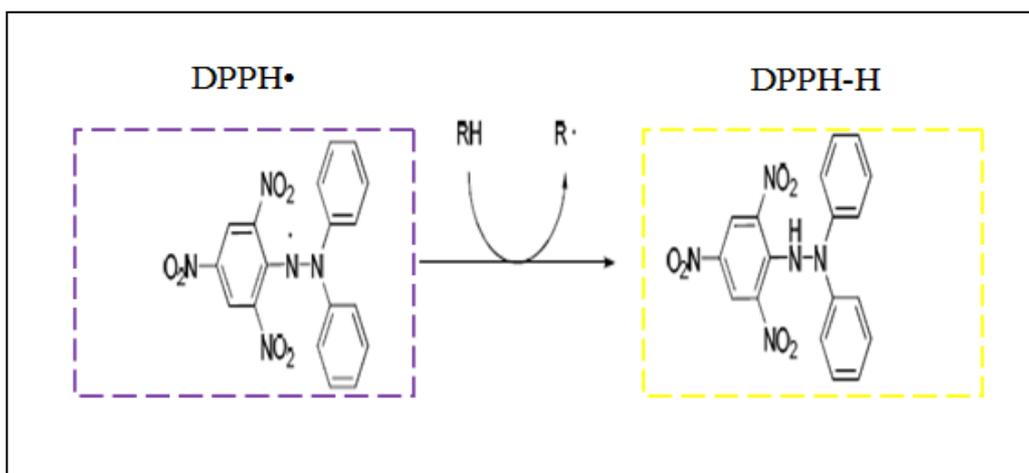


Figure 11: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (Prior et al. 2005).

Deux versions ont été suggérées dans le test de DPPH: dynamique et statique. Pour la première version, le mesure de la capacité de la réduction de DPPH• observé après l'addition de l'échantillon contenant des composés phénoliques, cette capacité peut être évaluée par la mesure de la diminution de son absorbance. Dans la deuxième version, la détermination de la quantité de DPPH• piégé par l'échantillon testés. Le potentiel d'hydrogène d'un échantillon testé est, fréquemment, exprimé par IC₅₀ (Molyneux 2004; Tejero et al. 2014).

Dans cette méthode, l'efficacité antioxydante est mesurée à température ambiante, en éliminant, ainsi, le risque de la dégradation thermique des molécules testées. La relation entre la capacité antioxydante de l'échantillon et la teneur en composé de couleur jaune dans le système réactionnel est linéaire et dépendante de la concentration. Par conséquent, l'activité anti-radicalaire d'un échantillon peut être exprimé comme sa capacité à piéger les radicaux DPPH• (Shang et al. 2018).

1.3.2.2. Test de décoloration de radical cation ABTS•⁺

Le test ABTS a été rapporté par la première fois par Miller et al. 1993, basé sur l'élimination des radicaux libres. Grâce à l'oxydation de l'ABTS avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) par l'activité de l'oxygène, l'ABTS incolore est transformé en ABTS•⁺ stable de couleur bleu/vert qui est spécifiquement absorbé à un λ_{max} de 734 nm (Figure 12), cette génération chimique nécessite un temps long avant l'essai (jusqu'à 16h).

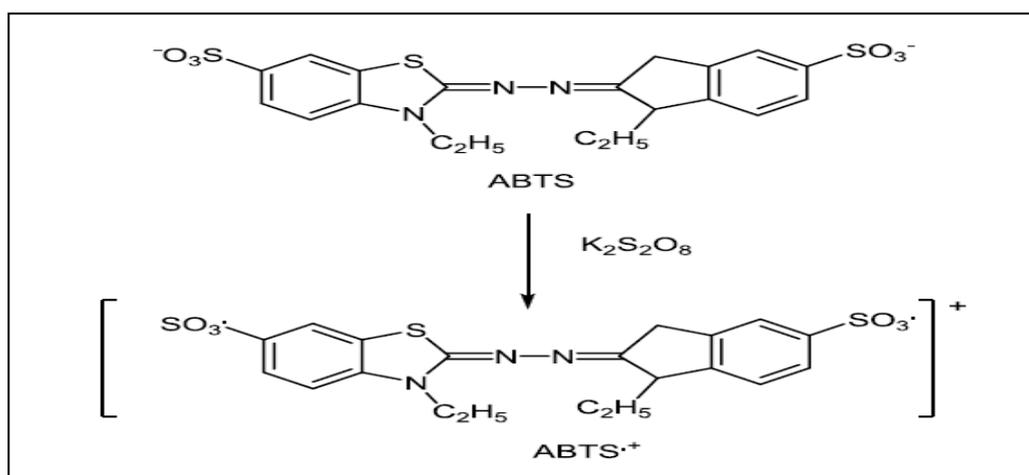


Figure 12: Oxydation de l'ABTS avec K₂S₂O₈ et sa génération (Ferhat 2016)

Lorsqu'on fait réagir ABTS•⁺ avec n'importe quel ingrédient antioxydant donneur d'hydrogène, ABTS•⁺ est réduit en l'ABTS incolore original. La réaction se fait comme suit: (Shang et al. 2018).



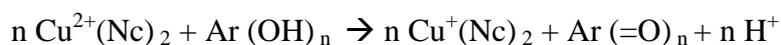
Par conséquent, la concentration de radical ABTS•⁺ peut être diminuée en mesurant la diminution de l'absorbance à 734 nm, cette diminution dépend de l'activité antioxydante (Re

et *al.* 1999). Ce test de décoloration des cations radicaux ne nécessite qu'un temps de réaction court (environ 15 min) et a été largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons biologiques (Shang et *al.* 2018).

1.3.2.3. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Apak et *al.* 2004), décrite le développement d'un test de capacité antioxydante par réduction de cuivre et largement applicable pour les flavonoïdes, les acides phénoliques, les acide hydroxycinnamiques, les thiols, les antioxydants synthétiques et les vitamines C et E. Le réactif oxydant chromogène utilisé pour le dosage CUPRAC est le cation Cu (II)-Néocuproïne (Cu (II)-Nc) (Özyürek et *al.* 2011).

Cette méthode, introduite par la chimie analytique, est basée sur la mesure de l'absorbance du chromogène Cu⁺-Nc formé à la suite de la réaction redox d'antioxydants avec le réactif Cu²⁺-Nc, où l'absorbance de la lumière de 450 nm, il s'agit donc d'une méthode à transfert d'électron (ET) (Figure 13); le réactif Cu²⁺-Nc est donc réagit avec (n-é) réducteur antioxydants de la manière suivante:



Dans cette réaction, les hydroxyles phénoliques (Ar-OH) des antioxydants sont oxydés en quinones correspondante (Ar=O) à travers la réduction du complexe Cu²⁺-Nc, produisant ainsi un complexe chromogène du Cu⁺-Nc intensément coloré en jaune-orangé, les protons libérés sont tamponnés dans un milieu d'acétate d'ammonium. Les réactions au CUPRAC sont, essentiellement, terminées en 30 min pour la plupart des antioxydants alimentaires/biologiques (Apak et *al.* 2004; Apak et *al.* 2013).

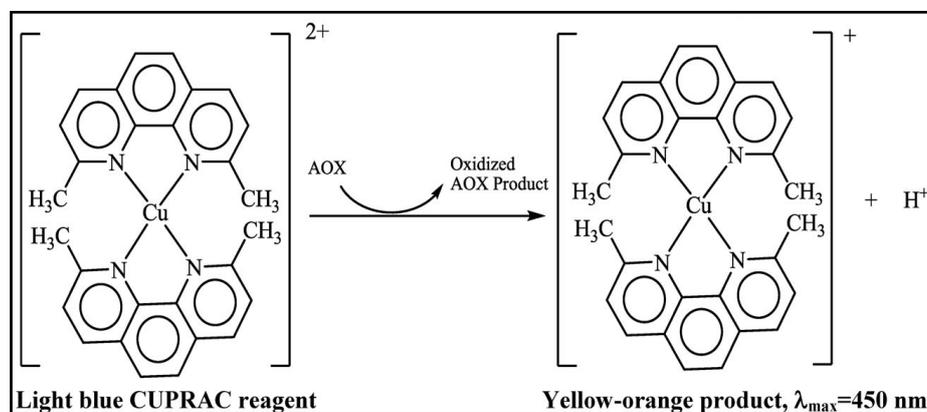


Figure 13: Réduction du complexe chromogène de Cu²⁺-Nc (Apak et *al.* 2013).

Une courbe de dilution générée par les normes d'un témoin, est utilisée pour convertir l'absorbance de l'échantillon en équivalents de standard c'est-à-dire la capacité antioxydante des composés et des extraits a été évaluée en tant que équivalent Trolox (valeur TEAC). Si les résultats sont exposés comme DO, TEAC pourrait être calculé comme $A_{0,50}$ (Prior et *al.* 2005).

2. Activité anticholinestérase

La maladie neurodégénérative est un terme appliqué à une variété de condition découlant d'une dégradation chronique et la détérioration des neurones, en particulier ceux du système nerveux central (Adewusi et *al.* 2010). La maladie Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1906 par un neuropchiatre bavarois, Alois Alzheimer.

La MA c'est l'un des troubles neurodégénératifs les plus rependus qui entraîne une perte progressive de la mémoire et de la cognition, ainsi qu'une détérioration de la quasi-totalité des fonctions intellectuelles (Ali-Shtaych et *al.* 2014). Ces changements sont dus au dysfonctionnement progressif et à la mort des cellules nerveuses responsables du stockage et du traitement de l'information ; les théories du vieillissement radicalaire et du stress oxydatif suggèrent que les dommages oxydatifs sont un acteur majeur de la dégénérescence des cellules. A cet égard, des découvertes récentes indiquent clairement que les dommages oxydatifs sont l'un des premiers événements dans la pathogenèse de la MA (Valdimir-Knezevic et *al.* 2014).

La physiopathologie de la MA est complexe et implique plusieurs voies chimiques. Le premier défaut neurotransmetteur découvert dans cette maladie a impliqué l'Ach (acétylcholine), qui joue un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage (Ibrahim et *al.* 2016). Normalement, l'Ach est une molécule organique produite par la choline acétyltransférase qui utilise l'acétyl coenzyme A et la choline comme substrats pour la formation de l'Ach est stockée dans les terminaisons nerveuses, et est libérée des terminaisons nerveuses lorsque celle-ci est dépolarisée, entrant ainsi dans la synapse et se liant au récepteur. Cependant, chez les patients atteints de MA, l'ACh qui est libérée a une demi-vie très courte en raison de la présence de grandes quantités d'enzymes, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) (Orhan et *al.* 2004; Ali-Shtayeh et *al.* 2014). Ces enzymes hydrolysent la liaison ester dans la molécule d'Ach, conduisant à une perte d'activité de cette dernière (Adewusi et *al.* 2010). La MA est donc caractérisée par des faibles taux

d'Ach dans le cerveau, le traitement clinique de cette maladie est palliatif et repose principalement sur l'amélioration de la fonction cholinergique par stimulation des récepteurs cholinergiques ou prolongeant la disponibilité d'Ach libérée dans la fente synaptique neuronales en utilisant des agents inhibiteurs à la fois de l'AchE et la BchE, qui connus sous le nom d'acétylcholinestérase inhibiteur (AChEI) et butyrylcholinestérase inhibiteur (BChEI) respectivement (Adewusi et al. 2010). Cette inhibition est considérée comme une stratégie prometteuse pour le traitement des troubles neurologiques (Orhan et al. 2004).

Puisque de fortes preuves expérimentales démontrent que le stress oxydatif est intimement impliqué dans les maladies neurodégénératives, plusieurs études ont examiné les effets positifs des antioxydants dans la réduction ou le blocage de la mort neuronale dans la physiothérapie de ces troubles. Par conséquent, l'utilisation d'antioxydant a été explorée dans le but de ralentir la progression de la MA et de la dégénérescence neuronale (Ali-Shtayeh et al. 2014).

Le dosage de l'activité anti-acétylcholinestérase joue un rôle important dans la caractérisation *in vitro* des médicaments, y compris les traitements potentiels de la MA (Ali-Shtayeh et al. 2014). Les activités inhibitrices de l'AchE et de la BchE ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique développée par (Ellman et al. 1961). Le principe chimique de la réaction est résumé dans la Figure 14.

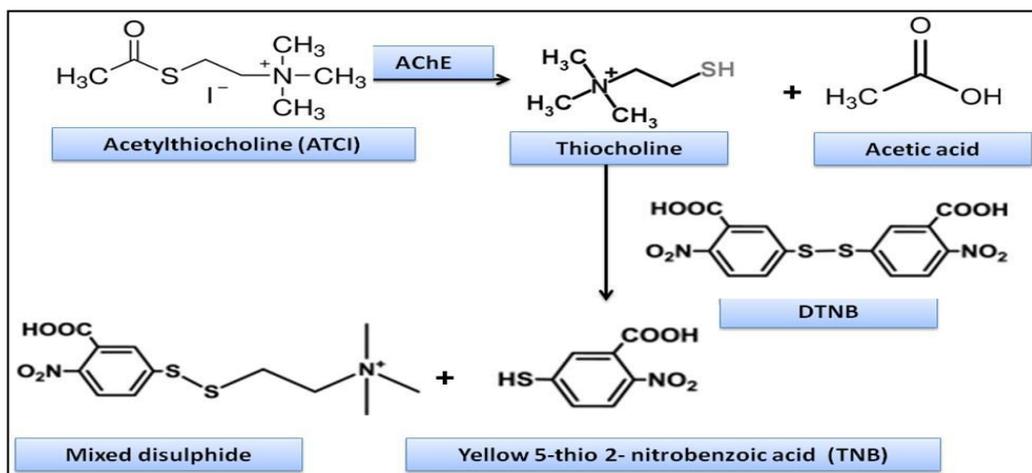


Figure 14: Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's (Ali-Shtayeh et al. 2014).

3. Activité antimicrobienne

3.1. Activité antibactérienne

De nombreux travaux antérieurs et actuels pour la recherche de nouvelles molécules étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir antibactérien de plantes médicinales en raison de l'évolution rapide des bactéries pathogène vers la multirésistance aux antibiotiques.

Un antibiotique est une substance originaire chimiothérapeutique produite par un microorganisme ou issu de la synthèse chimique qui, à faible concentration inhibe la croissance ou détruit certaine bactérie. Leur nature chimique et leur spectre d'action déterminent leur efficacité antibactérienne. Chaque antibiotique a des propriétés particulières en ce qui concerne son mode d'action: bactéricides (tuant les microbes) ou bactériostatique (bloquant la multiplication des microbes) (Bousseboua 2005).

3.2. Activité antifongique

Les antifongiques sont des substances qui détruisent des champignons responsables des mycoses: infections par des champignons microscopiques (fongicides) ou qui empêchent leur croissance et leur multiplication (fongistatique).

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Notre travail concerne des extraits d'une plante appartenant du genre *Mentha* (*Lamiaceae*) récoltée dans l'Est Algérien. Ces derniers ont été mis à notre disposition par l'équipe de recherche du laboratoire d'obtention des substances thérapeutique (Lost) sous la direction du Professeur Z. Kabouche.

Les extraits sont préalablement préparés comme suit:

- La partie aérienne de la plante est pulvérisée et mise à macérer dans un mélange éthanol/eau 80:20 après filtration et évaporation à sec un extrait éthanolique (ME) obtenu.
- Par la suite une extraction liquide/liquide est réalisée par épuisement par des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyl, n-butanol) permettant l'obtention de l'extrait chloroformique (MC).

Le choix de notre plante est basé sur le fait de sa large utilisation en médecine traditionnelle, sa disponibilité, la présence de molécules bioactives notamment les polyphénols et les flavonoïdes.

Les activités biologiques effectuées dans notre travail ont été réalisées dans le centre de recherche de biotechnologie –Constantine- pour le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante. Et dans le laboratoire n°14 de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Constantine 1 pour l'activité antimicrobienne.

2. Caractéristique quantitative des extraits

2.1. Dosage des polyphénols totaux

Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques totaux dans les extraits végétaux, nous avons appliqué dans notre étude un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu, a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le RFC (réactif de Folin-Ciocalteu), conduisant à la formation d'un produit coloré qui possède une absorption maximal à 765 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de polyphénols oxydés présents dans les extraits végétaux (cité par Boizot et charpentier 2006). Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique.

La teneur des polyphénols a été déterminée par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2010 par Muller:

100 μl de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés à 20 μl de chaque extrait de *Mentha* éthanolique et chloroformique (1 mg d'extrait sec est dissout dans un volume de 1 ml de MeOH). Un volume de 75 μl de la solution aqueuse de NaOH est ajouté pour neutraliser le mélange réactionnel. Parallèlement, un témoin négatif (blanc) a été réalisé. Le milieu réactionnel est conservé au repos pendant 2h à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Perkin-Elmer. Pour chaque concentration, le test est répété trois fois.

Une gamme étalon a été établie avec l'acide gallique pour calculer la concentration des composés phénoliques dans chaque extrait à l'aide de l'équation ($y = ax + b$) et les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec (μg EAG/mg d'extrait).

2.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes des deux extraits (ME et MC) est effectuée par une méthode décrite par Topçu et *al.* 2007. Cette méthode repose sur le principe du dosage direct par le nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). La coloration jaunâtre donnée dans ce test est due à la formation d'un complexe entre les ions Al^{3+} et les flavonoïdes.

Au niveau d'une microplaque multipuits, 100 μl de MeOH ont été ajoutés à 50 μl de chaque extrait mère, puis on a additionné 10 μl de CH_3COOK et un volume de 10 μl d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. En parallèle, le blanc est préparé avec 150 μl de MeOH et 50 μl d'extrait. Le test est répété dans trois puits pour chaque extrait. Enfin, la microplaque est incubée à température ambiante pendant 45 min. Après le temps d'incubation, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 415 nm à l'aide de lecteur Perkin-Elmer.

Les valeurs de concentration sont directement lues à partir de la droite d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence (quercitine), de la forme $\text{Abs} = ax + b$. Il s'ensuit que les valeurs moyennes de la teneur en flavonoïdes extractibles totaux sont exprimées en μg d'équivalents de la quercitine par mg d'extraits sec (μg EQ/mg d'extrait).

3. Activités biologiques *in vitro* des extraits

La plupart des tests antioxydants consiste à étudier la disparition ou la formation d'un produit spécifique dans un milieu soumis à un stress oxydatif. Ainsi, l'évaluation de l'activité antioxydante par une technique donnée ne fournit que des informations partielles sur l'activité des composés. Il est donc nécessaire de réaliser différents tests antioxydants, afin de percevoir la capacité réelle de protection d'un composé dans un milieu biologique complexe.

Ce travail consistait à évaluer l'activité antioxydante des deux extraits (ME et MC) de la plante par trois méthodes complémentaires avec des cibles des espèces oxydants variées, en comparaison avec deux antioxydants synthétiques (BHA et BHT) pour mieux apprécier l'effet antioxydant de la plante.

3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été réalisée au sein de laboratoire n° 2 de biochimie au niveau de Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine.

Pour chaque test, une quantité de 1 mg des extraits secs (ME, MC) a été dissout dans 1 ml de MeOH absolu afin d'obtenir les solutions mères. La gamme de concentration est préparée par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2 (Tableau 06).

Tableau 06: Série de dilutions avec les concentrations respectives des extraits

ME et MC							
Dilutions	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
[µg/ml]	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125

3.1.1. Test par capture du radical DPPH•

Selon Blois 1958, l'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH, la réduction du radical DPPH• par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm.

Un volume de 40 µl de chaque extrait avec un volume de 160 µl de DPPH a été ajouté dans chaque puits de la microplaque multipuits, les mesures ont été faites trois fois pour chaque concentration pour les deux extraits. Le contrôle négatif (blanc) a été préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. la lecture des absorbance a été mesurée à 517nm. La couleur violette disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picryl-hydrasine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. Le contrôle positif est représenté par deux antioxydants standards (BHA et BHT), trois essais ont été effectués.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante:

$$PI = (\text{Abs control} - \text{Abs test}) / \text{Abs control} \times 100$$

PI: pourcentage d'inhibition.

Abs: Absorbance à la longueur d'onde de 515 nm.

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH•. Elle est calculée graphiquement pour chaque extrait par analyse de régression linéaire (Merouane et *al.* 2014; Shang et *al.* 2018).

3.1.2. Test par piégeage du radical ABTS⁺•

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et *al.* 1999. Le test est décrit comme un essai de blanchissement (décoloration) d'une solution de cation radical bleu/vert 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS⁺•).

Dans chaque puit de la microplaque, 40 µl de chaque extrait à différents concentrations ont été mélangé avec 160 µl de l'ABTS⁺•. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 10 min et la décoloration par rapport au control négatif contenant (40 µl MeOH avec 160 µl ABTS⁺•) est mesurée à 734 mn par le lecteur de microplaque Perkin Elmer. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produits testés.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) et en IC₅₀ comme précédemment décrits pour le test DPPH•.

3.1.3. Test par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode est basée sur l'utilisation de réactif cuivre (II)-néocuproïne (Cu (II)-Nc) comme agent oxydant chromogène, ce dernier est réduit en présence d'un antioxydant qui conduit à la formation d'un chromophore de couleur jaune orangé où l'absorbance est enregistrée à longueur d'onde maximale d'absorption de la lumière de 450 nm.

Selon le protocole décrit par Apak *et al.* 2004, un volume de 40 µl de chaque extrait et ses concentrations ainsi que 60 µl du tampon (S1) puis un volume de 50 µl de la solution éthanolique (S3) sont déposés dans chaque puits de la microplaque, 60 µl de la solution aqueuse (S2) ont été ajoutés par la suite. La couleur du milieu réactionnel change alors du blanc au jaune orangé. Un blanc a été préparé en parallèle, en remplaçant les extraits par le MeOH. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait.

Après incubation durant 1h à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 450 nm par le lecteur Perkin-Elmer. Le contrôle positif est représenté par deux antioxydants de synthèses BHA et BHT.

3.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'inhibition de l'activité AchE a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à 96 puits basée sur la méthode colorimétrique légèrement modifiée développée par Ellman *et al.* 1961.

Selon le protocole décrit par Ertas *et al.* 2015, des aliquotes de 130 µl de tampon phosphate de sodium (pH=8), 10 µl de solution mère d'extrait avec les différentes concentrations convenables et 20 µl de la solution enzymatique AChE ont été induits dans chaque puits. Après une période d'incubation de 15 min à température ambiante 25°C, 10 µl de DTNB sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 10 µl de substrat AChI. Après incubation durant 15 min à l'étuve à 37°C, la lecture se fait à t=0 et t=15 min à 412 nm. Un témoin négatif est préparé, la galanthamine dissoute dans le MeOH est utilisée comme référence.

3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'objectif de cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique et l'extrait chloroformique de notre plante appartenant au genre *Mentha* sur quelques souches bactériennes et fongiques. Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire n°14

de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine 1.

Le test antimicrobien a été réalisé sur quatre souches bactériennes et deux souches fongiques de référence (lots d'American Type Culture Collection "ATCC") (Tableau 07).

Tableau 07: souches microbiennes testées.

Microorganismes	Les souches	Gram
Souches bactériennes	-E. Coli ATCC 14337	-
	-Klebsiella Pneumoniac ATCC 1870408553	-
	-Streptococcus aureus ATCC 6538P	+
	-Bacillus subtilis ATCC 6633	
Souches fongiques	-Candida ablicans ATCC 10231	/
	-Saccharomyces cerévisiae ATCC 9763	/

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antifongique en milieu solide dans une boîte de pétri avec création d'un gradient de concentration. Après un certains temps de contact entre le produit et le microorganisme cible, l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée en résistante, sensible, très sensible et extrêmement sensible vis-à-vis de l'extrait étudié.

Les souches sont repiquées sur gélose nutritive (GN) préparée à une concentration de 23g/l. Puis, la solution est calibrée à PH=7. Enfin, le tout est bouillit avec agitation sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète.

Le milieu de culture utilisé est le milieu Muller-Hinton (MH). Les flacons sont déjà prêts à l'emploi, il ne reste que les faire dissoudre dans un bain-marie pour couler les boîtes de pétri (l'épaisseur du milieu doit être de 4mm car une fine couche augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un faux résultat).

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes et fongiques qui ont été repiquées et incubées à 37°C pendant 24h, sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile. Puis, le contenu de l'anse de platine est traversé dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile (9g de NaCl/100 ml d'eau distillée): les colonies sont émulsionnées sur le bord du tube en dehors de l'eau puis peu à peu dans le liquide. Ensuite, vigoureusement agitées.

- **Ensemencement**

120 µl d'inoculum bactérien ou fongique est déposé et étalé à l'aide d'un écouvillon stérile sur la surface des boîtes de pétri stériles contenant le MH, préalablement coulées. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène de l'inoculum, en étalant la suspension à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application. Enfin, écouvillonner partout autour du bord de la surface de la gélose. On procède par la suite à la mise des puits sur le fond de la boîte de pétri. A l'aide d'une pipette Pasteur, quatre puits bien éloignés ont été marqués dans la gélose. Ensuite, chacun d'eux est effectué à l'aide d'une pince métallique stérile. Chaque puit a reçu 20 µl de l'extrait à tester aux différentes concentrations effectuées par la méthode de la double dilution de raison 1/2 comme suit: 25/ 10/ 5/ 2,5 mg/ml. Enfin, les boîtes de pétri sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h. L'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits afin que la souche soit interprétée en résistante, sensible, très sensible et extrêmement sensible vis-à-vis des extraits étudiés selon (Ponce et *al.* 2003).

Résultats et discussions

1. Dosage de polyphénols totaux des extraits de la plante *Mentha*

La couleur bleue foncée qui apparaît indique la présence de polyphénols dans les deux extraits éthanolique et chloroformique de notre plante. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols. L'absorbance est lue à $\lambda_{\max}=765$ nm (Figure 15 a et b).

A ce niveau, nous constatons que l'extrait chloroformique semble être plus riche en polyphénols que l'extrait éthanolique.

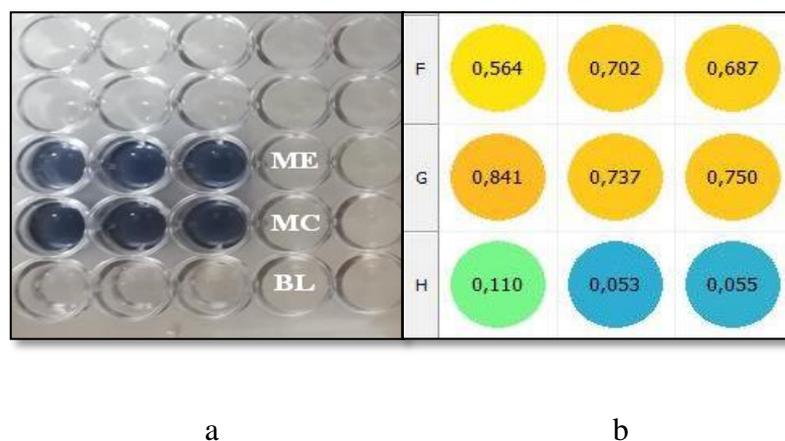


Figure 15: Illustration de dosage des polyphénols totaux (a) des extraits et les valeurs d'absorbance (b).

Le dosage de polyphénols totaux a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard.

La teneur en polyphénols totaux (TPC) de nos extraits a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique. La gamme de l'acide gallique est tracée pour des concentrations comprise entre 25 et 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 16).

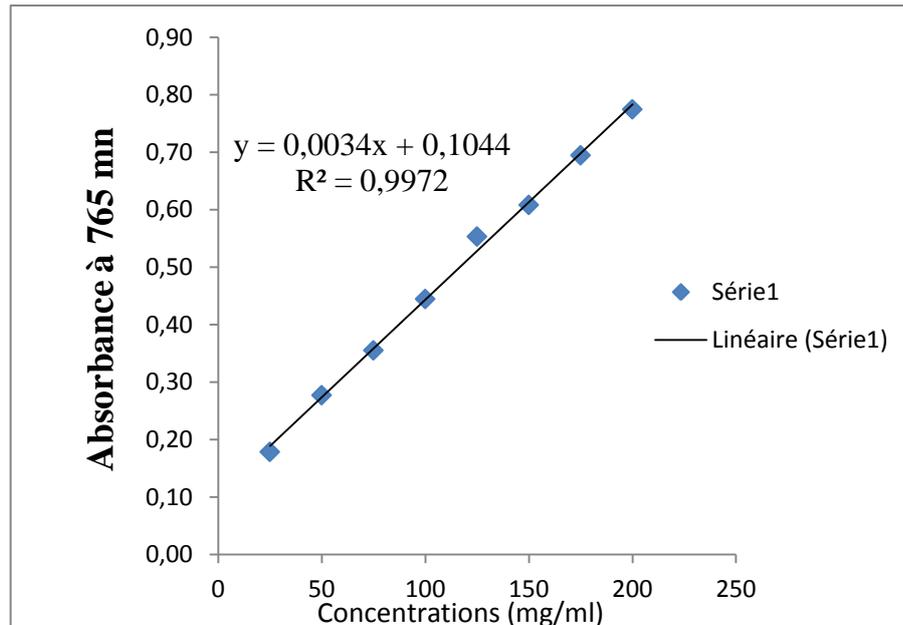


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux
DO=f (concentration)

Les résultats du dosage des composés phénoliques de différents extraits ont été répertoriés dans le (tableau 08). La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de la plante est exprimée en μg équivalent en acide gallique par mg de l'extrait sec (μg EAG/mg d'extrait).

Tableau 08: Taux des composés phénoliques des extraits de la plante *Mentha*

Extraits	Moyennes ($\mu\text{Geag/mg}$ d'extrait)
ME	196,83 \pm 3,53
MC	213,16 \pm 3,06

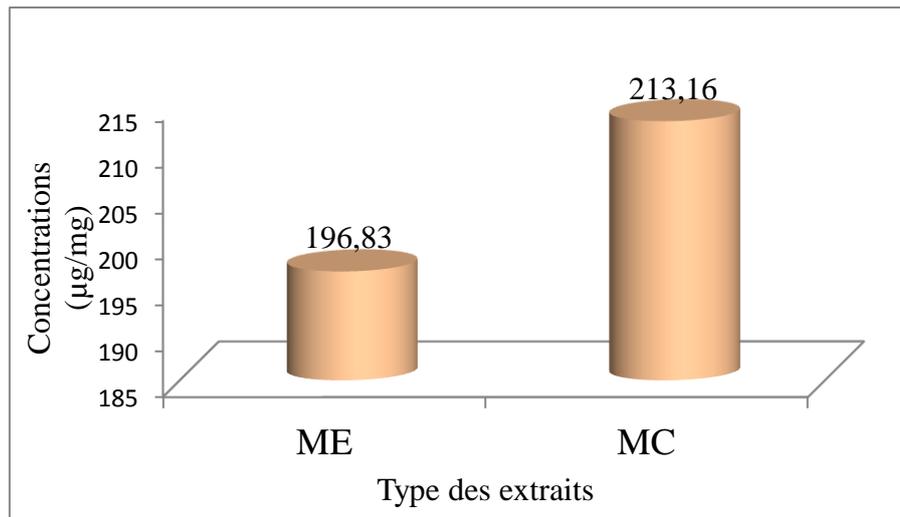


Figure 17: Quantité de composés phénoliques des extraits de la plante *Mentha*

Les résultats regroupés dans le tableau 08 et la figure 17, confirme la richesse des deux extraits en polyphénols. Cependant, l'extrait chloroformique est le plus concentré en polyphénols.

Ces résultats montrent des teneurs élevées en polyphénols par rapport aux valeurs déterminées par Barchan et *al.* 2014 dans l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* avec un taux de $167,2 \pm 0,41$ µg/mg.

Nos résultats restent supérieurs à ceux trouvés par Khennouf et *al.* 2013 ayant travaillé sur des extraits méthanolique et chloroformique de *Mentha pulegium* avec la méthode de Folin-Ciocalteu. Ils ont relevé des valeurs de $183,45 \pm 0,31$ et $119,73 \pm 0,034$ µg EAG/ml d'extrait respectivement. De même, Nickavar et *al.* 2008 ont obtenus des teneurs en polyphénols d'un extrait éthanolique de l'espèce *Mentha spicata* $150,91 \pm 5,14$ µg/mg, ces valeurs sont inférieures à ceux trouvés lors de notre études.

Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont la méthode d'extraction et d'analyse, la nature et le standard utilisé, l'origine géographique (taux d'ensoleillement), le degré de maturité et les conditions de stockage.

La concentration en composés phénoliques est aussi influencée par la saison. Selon Bey Mostapha et *al.* 2014, la lumière stimule la biosynthèse des polyphénols chez les plantes par l'amplification de certaines activités enzymatiques, dont l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine en acide coumarique, qui est le précurseur des molécules impliquées dans la synthèse des composés phénoliques.

Les polyphénols contribuent à la prévention des maladies dégénératives et cardiovasculaires (Manach et *al.* 2004). Ils participent à la génération des certains antioxydants tel que la vitamine E. ils sont également capables de piéger les radicaux libres. (Doukani et *al.* 2014).

2. Dosage de flavonoïdes totaux des extraits de la plante *Mentha*

Les premiers résultats obtenus sont représentés par la réaction colorimétrique et les valeurs d'absorbance (Figure 18 a et b).

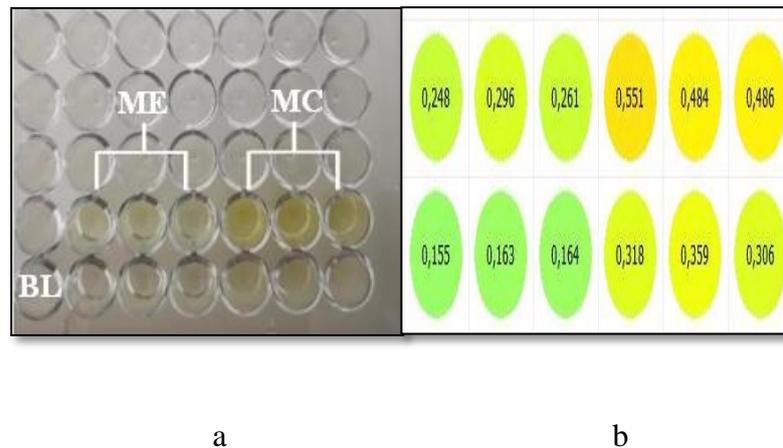


Figure 18: Illustration de dosage des flavonoïdes totaux (a) des extraits et les valeurs d'absorbances (b).

La couleur jaune produite indique la présence des flavonoïdes dans les mélanges réactionnels, l'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présentée dans nos extraits.

L'analyse de la figure 18 montre que la couleur et l'absorbance sont plus fortes dans l'extrait chloroformique que l'extrait éthanolique.

La quantité de flavonoïdes totaux des extraits testés à une concentration fixe (1mg/ml) est alors estimée à l'aide de la droite d'étalonnage de la quercitine à partir des valeurs absorbances mesurées (Figure 19).

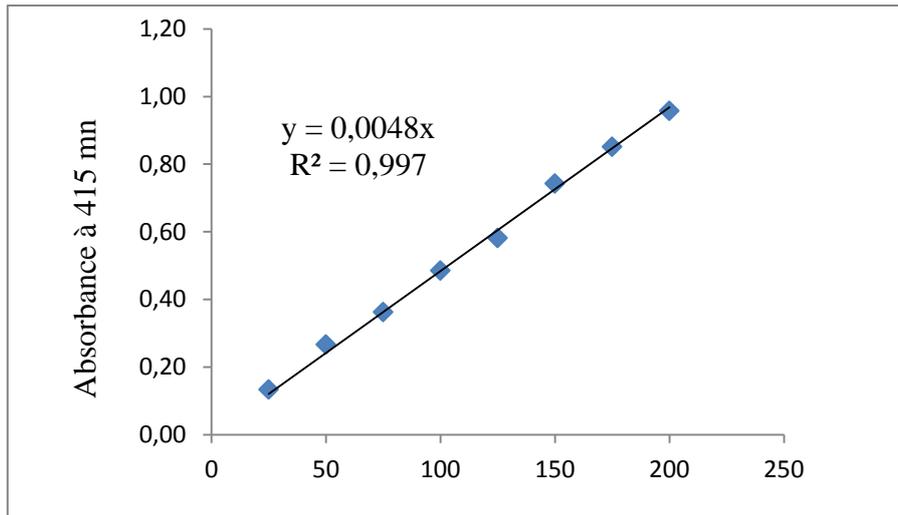


Figure 19: Courbe d'étalonnage de la quercitine pour le dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux contenues dans les échantillons de *Mentha* (fraction éthanolique et fraction chloroformique), a été énumérée dans le (tableau), et est exprimée en μg équivalent en quercitine par mg de l'extrait sec ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

Tableau 09: Taux des flavonoïdes des extraits de la plante *Mentha*

Extraits	Moyennes ($\mu\text{Geq/mg}$ d'extrait)
ME	63,62±2,29
MC	121.25±0,35

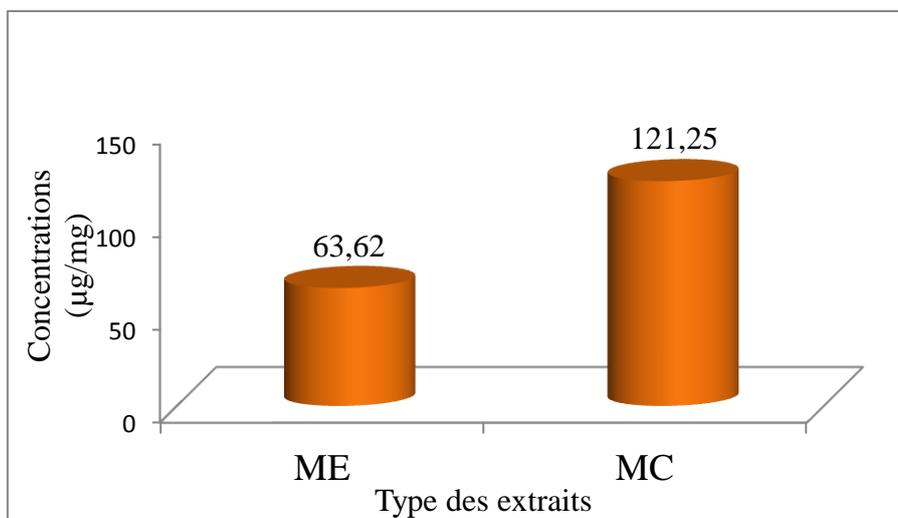


Figure 20: Quantité de flavonoïdes totaux des extraits de la plante *Mentha*

D'après les résultats rassemblés dans le tableau 09 et illustrés par la figure 20, nous observons que le taux de flavonoïdes le plus élevé est détecté dans l'extrait par chloroforme $121.25 \pm 0,35 \mu\text{g EQ/mg}$, il est presque deux fois supérieur à celui relevé dans l'extrait éthanolique $63,625 \pm 2,29 \mu\text{g EQ/mg}$.

Nos résultats de l'extrait éthanolique sont proches de ceux trouvés par Khennouf et *al.* 2013 pour un extrait méthanolique du *M.pulegium* $59,87 \pm 0,01 \mu\text{g EAG/g}$ d'extrait, mais restent largement supérieurs à ceux de l'extrait chloroformique de la même espèce $19,50 \pm 0,01 \mu\text{g ETA/g}$ d'extrait vis-à-vis de ce qu'on a trouvé comme teneur dans notre extrait chloroformique.

Ghazghazi et *al.*, 2013 ont rapportés une TFC d'un extrait méthanolique de *M.pulegium* collectée dans le nord de la Tunisie de $37 \mu\text{g/ml}$, cette valeur est extrêmement inférieure à celle de notre extrait éthanolique.

Selon la bibliographie, les flavonoïdes sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques attribuées en partie, à leur capacité de piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et les super-oxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) (Bartosz 2003), ils sont inactives et stabilisent ces radicaux par leur groupe hydroxyle ($\text{C}_3\text{-OH}$). Ces composés sont également capables de chélater les ions métalliques et ils peuvent inhiber les réactions enzymatiques dans le stress oxydatif (Derouiche et *al.* 2017).

3. Activité antioxydante

3.1. Piégeage du radical libre DPPH:

Les premiers résultats obtenus sont représentés par la réaction colorimétrique et les valeurs des absorbances (Figure 21 a et b).

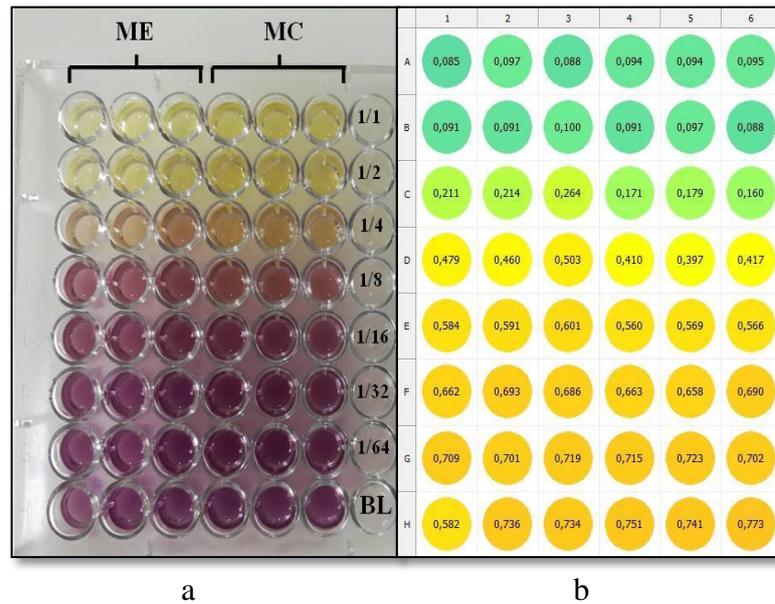


Figure 21: illustration de la réaction colorimétrique (a) du test DPPH des extraits et les valeurs d'absorbances (b).

Les pourcentages d'inhibition selon les différentes concentrations effectuées sont mentionnés dans le tableau 10.

Tableau 10: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon les différentes concentrations effectuées des extraits.

Extraits	% d'inhibition						
	3,125 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
ME	1,37±1,25	5,44±2,26	17,72±1,19	34,75±1,87	70,47±0,29	86,94±0,72	87,49±0,87
MC	0,86±1,47	6,83±2,39	21,47±0,64	43,29±1,41	76,37±1,33	87,21±0,64	86,89±0,08

D'après le tableau ci-dessus, il est constaté que les deux extraits ont pu inhiber le radical DPPH à toutes les concentrations effectuées, avec des valeurs ± variables. Plus la concentration augmente, plus le % d'inhibition augmente.

Deux courbes de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des deux extraits utilisés sont tracées afin d'obtenir l'index IC₅₀. Ce paramètre est défini comme étant la concentration en composés phénoliques requise pour inhiber 50% de l'activité de DPPH initiale (Merouane et al. 2014).

L'IC₅₀ est déterminé graphiquement par la régression linéaire du graphe tracé démontré dans les figures suivantes:

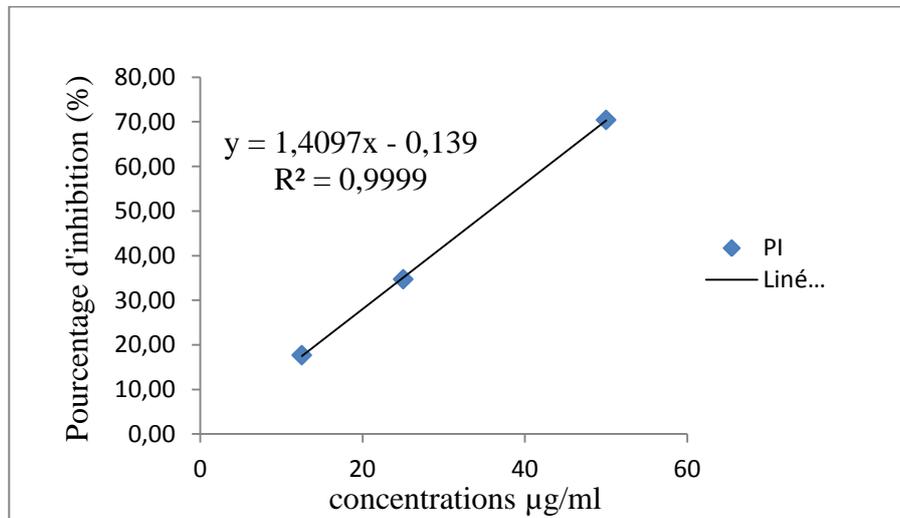


Figure 22: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique.

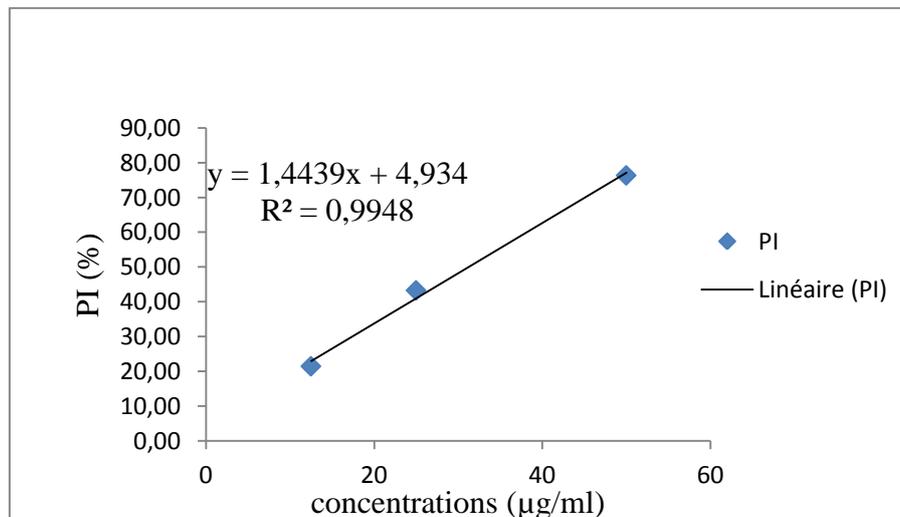


Figure 23: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique

L'examen des figures montre que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations. Autrement dit: le PI ou le piégeage des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des deux extraits et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicallaire.

La lecture du graphe nous a permis aussi d'estimer la valeur d'IC₅₀ qui est de l'ordre de 35,39±0,79 mg/ml pour l'extrait éthanolique et de 31,23±0,09 mg/ml pour l'extrait chloroformique. Les valeurs d'IC₅₀ sont proches de celle du standard BHT.

Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'extrait est considéré comme antioxydant puissant. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues confirment que nos extraits sont dotés d'un pouvoir antioxydant considérable.

Les valeurs d'IC₅₀ concernant les deux extraits, le BHA et le BHT sont résumées dans le tableau 11 et la figure 24.

Tableau 11: Valeurs d'IC₅₀ des extraits et standards.

Extraits	IC ₅₀ µg/ml
ME	35,39 ± 0,79
MC	31,23 ± 0,09
BHT	22,32±1,19
BHA	5,73±0,41

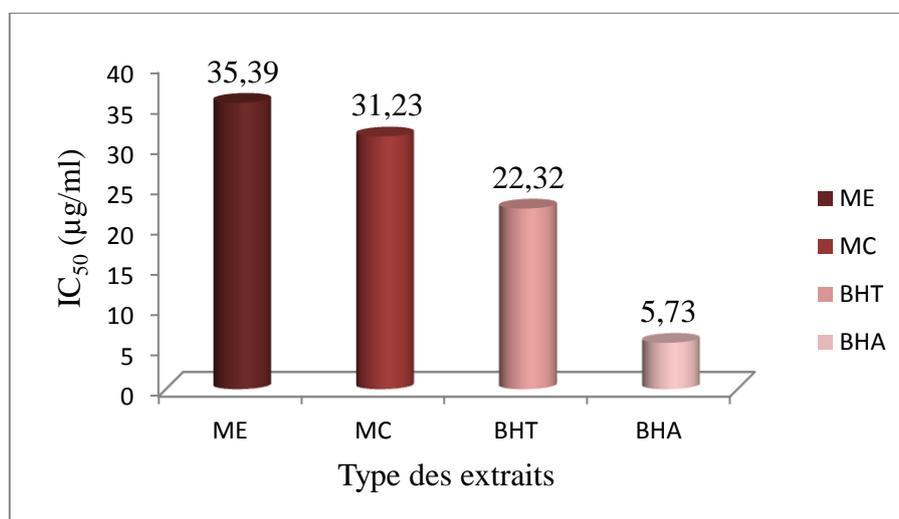


Figure 24: Comparaison des valeurs d'IC₅₀ des extraits de la plante et les standards utilisés

Par comparaison aux contrôles positifs représentés par le BHT et le BHA (IC₅₀ vaut 22,32±1,19 et 5,73±0,41µg/ml respectivement), nos extraits présentent un pouvoir antioxydant

inférieur à celui des deux standards. Cependant, ce potentiel antioxydant est plus grand par rapport à ceux obtenus pour l'extrait méthanolique de trois espèces de Menthe des valeurs de IC_{50} de 160 $\mu\text{g/ml}$, 490 $\mu\text{g/ml}$ et 400 $\mu\text{g/ml}$ pour *M.spicata*, *M.pulegium* et *M.piperita* respectivement (Barchan et al. 2014). Egalement l'extrait méthanolique de *M.villosa* a une capacité antioxydante inférieure à celle de nos extraits avec une $IC_{50}=44,66 \mu\text{g/ml}$ (Benabdallah et al. 2016).

Une autre étude réalisée par Ghazghazi et al. 2013 en Tunisie sur *M.pulegium* a montré une activité antioxydante ($IC_{50}=56 \mu\text{g/ml}$) d'un extrait au méthanol moins performante que l'extrait éthanolique et chloroformique de notre plante.

Pour mieux apprécier l'efficacité de notre plante, on cite à titre de comparaison les résultats mentionnés pour l'HE de *M.piperita* récemment analysée en Tunisie donnant une IC_{50} de 61,28 $\mu\text{g/ml}$ (Belassoued et al. 2018), au Maroc avec une IC_{50} de 53,67 $\mu\text{g/ml}$ (Derwich et al. 2011), en inde avec $IC_{50} =273\mu\text{g/ml}$ (Samarth et al. 2008), en Egypte avec $IC_{50} = 59,19\mu\text{g/ml}$ (Gharib et Da silva 2013) et en Turquie avec une $IC_{50} =61,28 \mu\text{g/ml}$ (Kizil et al. 2010).

Le pouvoir antioxydant de notre plante est probablement lié à sa teneur en composés phénoliques due à leur potentiel d'oxydoréduction élevé, ce qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et des désactivateurs d' O_2 singlet (Miguel 2010).

A la fin, il faut signaler que la variabilité des résultats obtenus pour plusieurs espèces et dans des régions multiples est bien évidemment liée à la différence dans la composition chimique des espèces et à des facteurs saisonniers.

3.2. Test à l'ABTS

Les premiers résultats obtenus sont représentés par la réaction colorimétrique et les valeurs des absorbances (Figure 25 a et b).

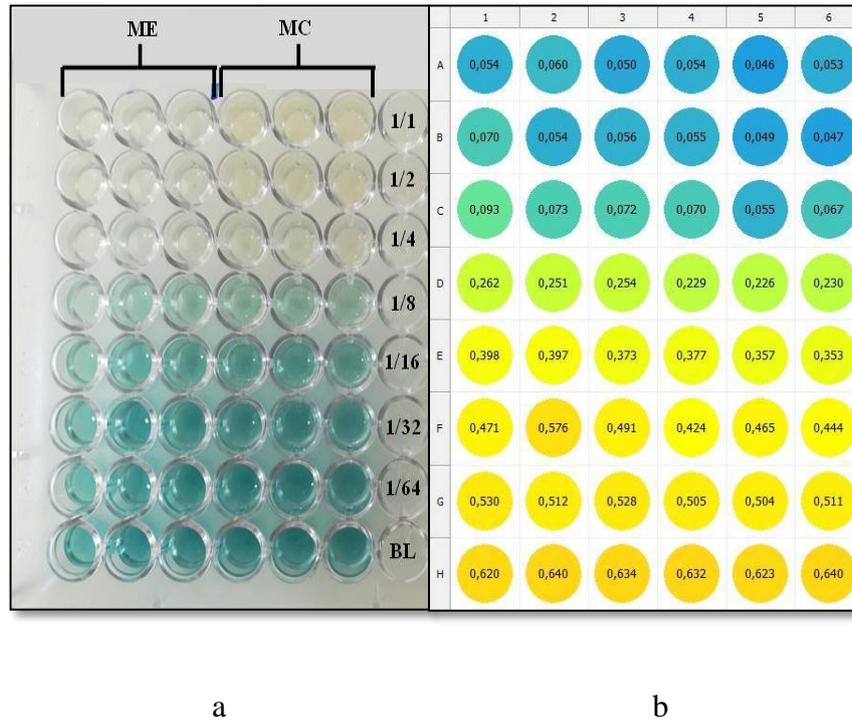


Figure 25: Illustration de la réaction (a) du test ABTS et les valeurs d'absorbances (b).

Les premiers résultats montrent que la disparition de la couleur indique la présence d'une activité antioxydante.

Les résultats obtenus donnant les valeurs des pourcentages d'inhibition enregistrés pour chaque concentration effectuée sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Pourcentages d'inhibition de l'ABTS selon les concentrations des deux extraits

Extraits	% d'inhibition de l'ABTS						
	3,125 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
ME	17,11±1,56	23,81±2,24	38,33±2,24	59,50±0,90	87,43±1,88	90,50±1,38	91,23±0,80
MC	19,75±0,60	29,62±3,25	42,61±2,04	63,83±0,33	89,86±1,26	92,03±0,66	91,92±0,69

L'analyse des valeurs enregistrées dans le tableau ci-dessous, nous permettent de constater ce qui suit:

En premier lieu, il y'a une relation directe entre les concentrations et le pourcentage d'inhibition. Plus la concentration augmente, plus le pourcentage d'inhibition augmente. Les pourcentages d'inhibition restent élevés jusqu'à la concentration de 3.125 µg/ml.

Les courbes ci-dessous représentent le pourcentage d'inhibition du test ABTS en fonction des concentrations (de chaque extrait) (Figure 26) (Figure 27) tracées afin de déterminer graphiquement la concentration d'inhibition de 50% du radical ABTS (IC₅₀).

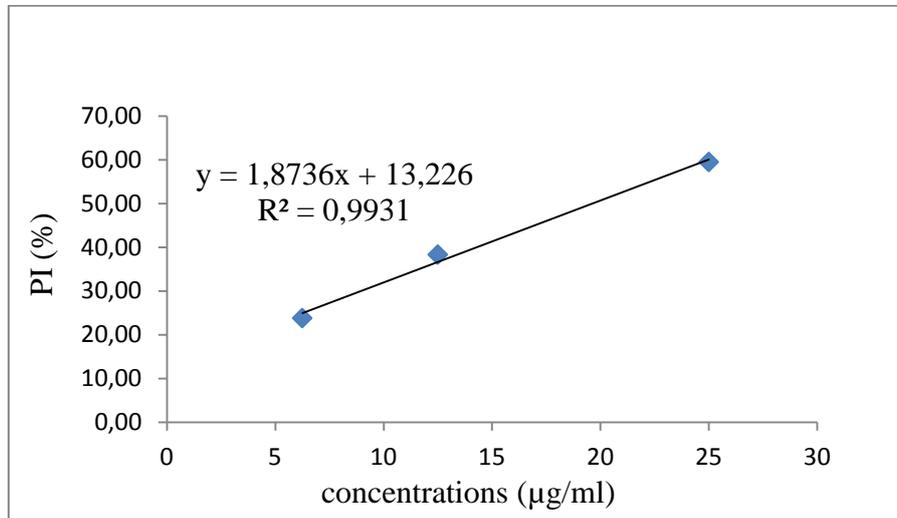


Figure 26: pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique

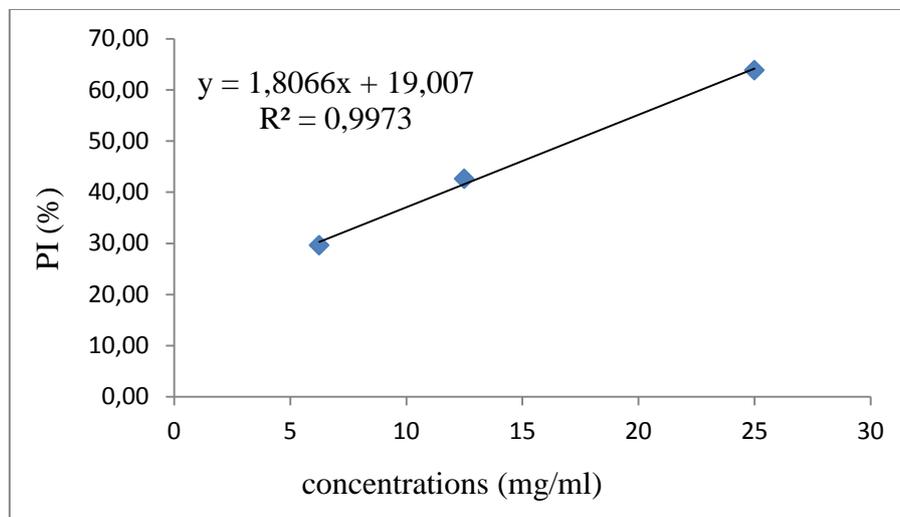


Figure 27: pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique

La lecture des graphes montre une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition de et la concentration de chaque extrait. Cela nous permet de constater que notre plante présente un pouvoir antioxydant. Ce pouvoir antioxydant a enregistré une valeur d'IC₅₀=19,64±0,77 µg/ml pour l'extrait éthanolique et IC₅₀=16,64±1,03 pour l'extrait

chloroformique (Tableau 13). Cela indique que les deux extraits possèdent des activités antioxydantes moins importantes que les deux antioxydants de référence (Figure 28). L'extrait chloroformique est plus actif par rapport à l'extrait éthanolique. Cela pourrait être probablement à la présence d'un taux élevé de composés phénoliques dans l'extrait chloroformique.

Tableau 13: Valeurs des IC₅₀ des extraits de *Mentha* et les standards utilisés

Extraits	IC ₅₀ µg/ml
ME	19,64±0,77
MC	16,64±1,03
BHT	1,29±0,30
BHA	1,81±0,10

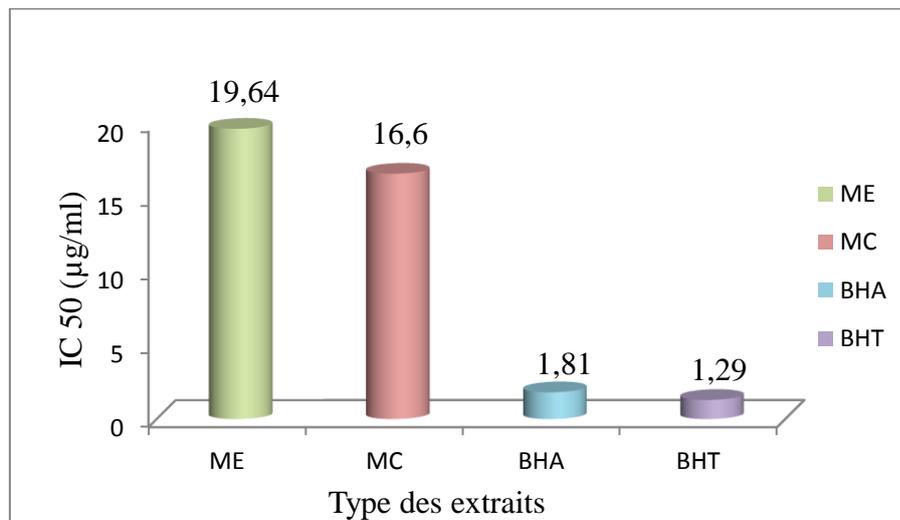


Figure 28: Histogramme représentant les valeurs des IC₅₀ des extraits de *Mentha* et standards utilisés.

Le potentiel de réduction de l'ABTS de notre plante reste performant par rapport à certaines activités antioxydantes ABTS relevées dans la littérature. C'est le cas de l'évaluation des propriétés antioxydantes d'un extrait éthanolique de cinq espèces du genre *Mentha* (Iran) qui ont enregistré des valeurs de IC₅₀ de l'ordre de 185,60 µg/ml, 153,80 µg/ml, 152,60 µg/ml,

158,90 µg/ml, 173,80 µg/ml pour *M. Longifolia*, *M. Piperita*, *M. Pulegium*, *M. Rotundifolia*, *M. Spicata* respectivement (Nickavar et al. 2008).

Une autre étude publiée en 2014 en Grèce, a porté sur une comparaison des polyphénols et de l'activité antioxydante de certaines herbes et épices de la famille des Lamiaceae et Umbelliferae a mentionné une valeur d'IC50 de l'ordre de 134 µg/ml pour *M. Spicata*. L (Gougoulis 2014).

Tout cela confirme que notre plante est dotée d'une activité antioxydante considérable. Cela est dû généralement à sa richesse en composés phénoliques ayant des propriétés redox qui peuvent soutenir l'efficacité de ces composés comme piègeurs des radicaux libres et antioxydants (Baba et Malik 2015).

En outre, il devrait être pris en considération que les capacités antioxydantes pourraient être attribuées à la structure chimique des composés présents dans l'extrait brut (Benabdallah et al. 2016).

3.3. Test de la capacité antioxydante par la réduction de cuivre (CUPRAC)

La réaction de cette méthode est basée sur la conversion par oxydation des groupes hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction de réactif Cu^{2+} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^+ -Nc de couleur jaune-orangée (Apak et al. 2013). L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la diminution des groupes (-OH) des polyphénols et parallèlement à l'augmentation des quinones et alors des complexes Cu^+ -Nc dans les milieux réactionnels. Le développement de la couleur peut être évalué par la mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur Perkin Elmer (Figure 29 a et b).

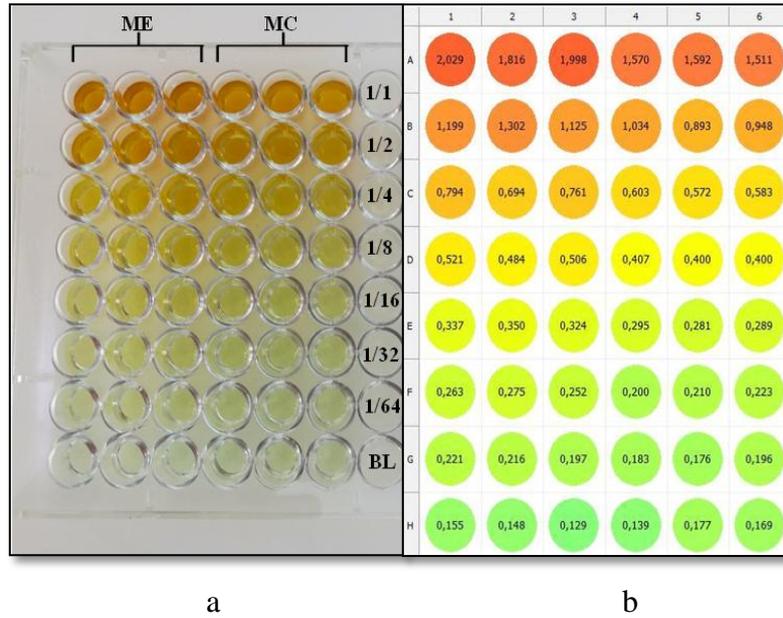


Figure 29: Illustration de la réaction colorimétrique (a) du test CUPRAC des extraits et les valeurs d'absorbances (b).

Les absorbances obtenues vis-à-vis les différentes concentrations des extraits réalisés, sont énumérées dans le tableau 14. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme des antioxydants de référence pour l'estimation de pouvoir antioxydant de nos extraits éthanolique et chloroformique.

Tableau 14: Valeurs des absorbances en fonction de la concentration des deux extraits éthanolique et chloroformique.

Extraits	Absorbances						
	3,125 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
ME	0,21±0,01	0,26±0,01	0,34±0,01	0,50±0,02	0,75±0,05	1,21±0,09	1,95±0,12
MC	0.19±0,01	0,21±0,04	0,29±0,01	0,40±0,00	0,59±0,02	0,96±0,07	1,56±0,04
BHT	0.19±0.01	0.33±0.04	0.66±0.07	1.03±0.07	1.48±0.09	2.04±0.14	2.32±0.28
BHA	0.46±0.00	0.78±0.01	1.34±0.08	2.36±0.17	3.45±0.02	3.76±0.03	3.93±0.01

D'après le tableau ci-dessus, il est constaté que les deux extraits possèdent un pouvoir antioxydant varie en fonction de la concentration: plus la concentration est élevée plus l'absorbance est augmente.

L'analyse du tableau montre également que les valeurs d'absorbances des deux extraits sont très proches de celles du standard BHT, ce qui indique la présence d'une réduction de l'ion cuivre mais avec un léger potentiel antioxydant. Cependant, l'extrait éthanolique est avéré plus performant que l'extrait chloroformique.

Les résultats obtenus, nous permettent de tracer deux courbes des absorbance en fonction des concentrations de chaque extrait (Figure 30) (Figure 31).

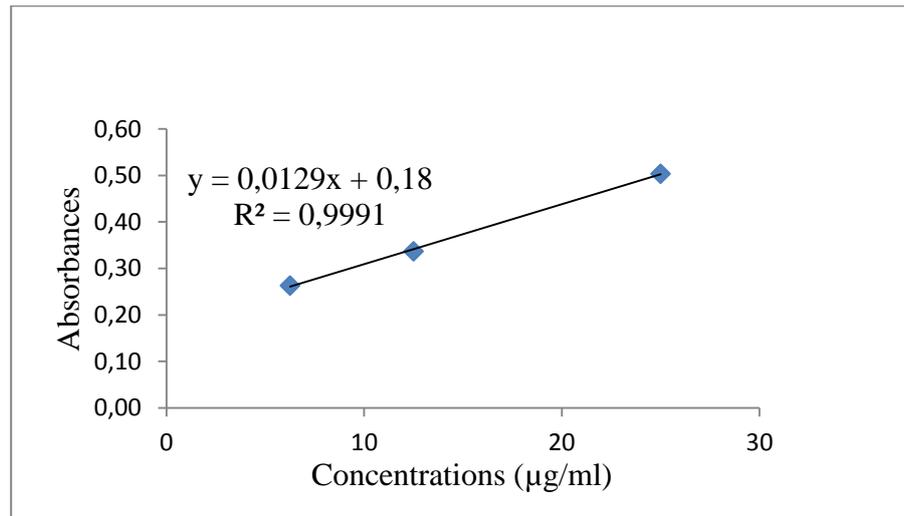


Figure 30: Absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique

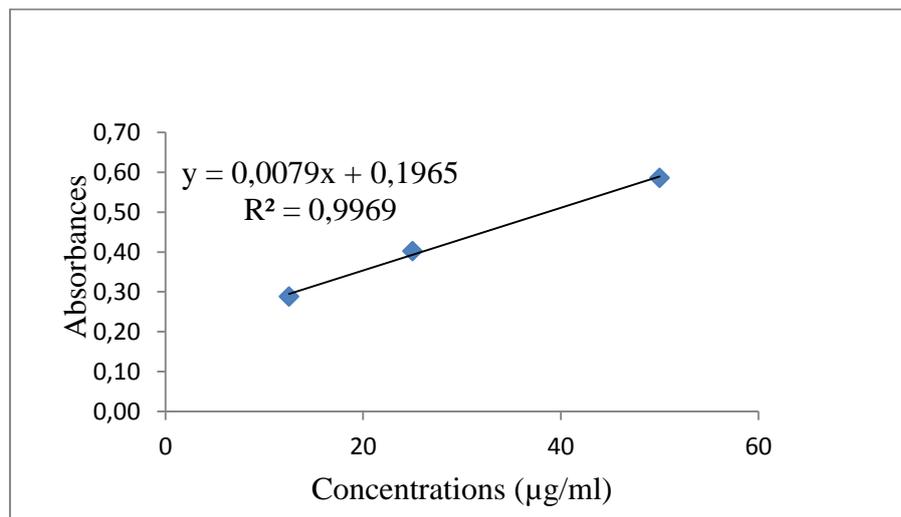


Figure 31: Absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique.

- Conclusion

A l'issu de l'étude de l'activité antioxydante et le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux, il ressort que la partie aérienne de notre plante appartenant au genre *Mentha* est douée d'une activité antioxydante considérable et en teneur importante en polyphénols et flavonoïdes. Ceci est attribué au fait que les polyphénols sont des composés qui présentent des propriétés d'oxydoréduction conduisant à l'inhibition des radicaux libres (Bartosz 2003). En conséquence, la présence des composés phénoliques dans les extraits d'une plante contribue de manière significative à leurs propriétés antioxydantes, c'est ce qui conduit selon Bidie *et al.* 2011 à conclure que les plantes qui possèdent une bonne activité antioxydante contiennent de fortes teneurs en groupements phénoliques.

La capacité de la Menthe à piéger les radicaux libres (prouvée par le test du DPPH, ABTS et CUPRAC) confère à la menthe un grand intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires, les cancers, les diabètes, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement (Talbi *et al.* 2015).

4. Activité anti-cholinestérase

Les premiers résultats obtenus sont représentés par la réaction colorimétrique et les valeurs des absorbances en t=0 et t=15 min (Figure 32 a et b).

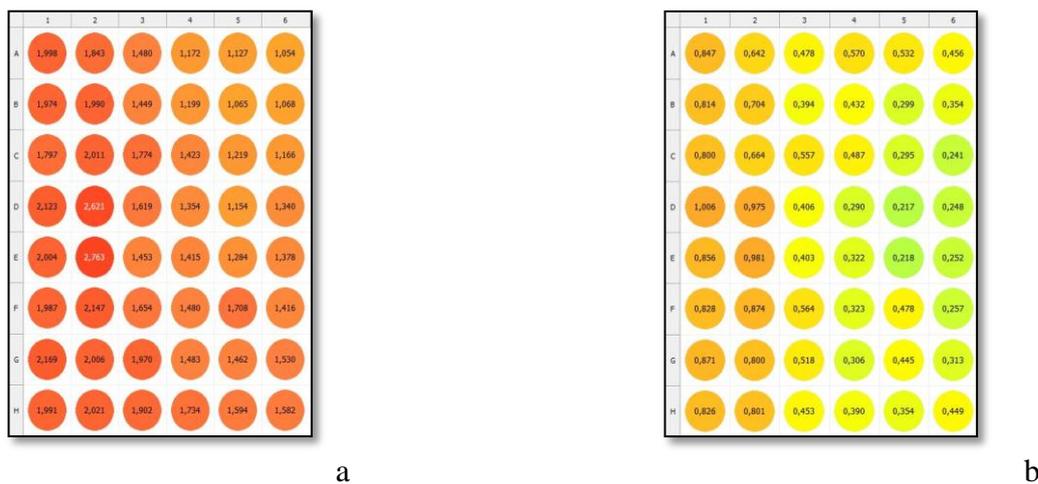


Figure 32: Illustration de la réaction colorimétrique et les absorbances en t=0 (a) et en t=15 min (b) de l'activité anti-cholinestérase.

Le tableau 15 montre les valeurs négatives obtenues:

Tableau 15: Pourcentages d'inhibition négatifs de l'acétylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.

Extrais	% d'inhibition						
	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.125 µg/ml
ME	-35.24±12.52	-41.17±13.99	-43,59±21,40	-60,32±34,09	-60,48±48,07	-42,02±11,18	-59,52±15,04
MC	27,62±0,42	9,40±3,67	-12,30±0,81	-24,72±9,99	-32,46±3,64	-42,98±5,03	-37,54±12,80

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, il est constaté que l'extrait éthanolique n'a aucun effet inhibiteur sur l'enzyme acétylcholinestérase à toutes les concentrations effectuées. Cependant, l'extrait chloroformique semble avoir une très petite activité inhibitrice à la concentration de 100 µg/ml et 200 µg/ml mais il reste sans effet à toutes les autres concentrations avec des pourcentages d'inhibitions négatifs.

5. Activité antimicrobienne

De nombreuses études récentes concernant des plantes du genre *Mentha*, sous forme des extraits ou d'huiles ont visé à montré le potentiel thérapeutique de diverses espèces trouvées dans de nombreuses régions du monde. En particulier, les effets antimicrobiens contre divers agents infectieux, tel que les bactéries et les champignons ont été étudiés. Le but de cet examen devait présenter l'activité antibactérienne et antifongique de deux extraits d'une plante algérienne du genre *Mentha* contre divers microorganismes qui causent des maladies.

L'activité antimicrobienne des deux extraits (éthanolique et chloroformique) de notre plante est testée vis-à-vis de quatre souches bactériennes, via la méthode de diffusion sur gélose. Le pouvoir antimicrobien de chaque extrait est estimé en terme de diamètre d'inhibition représenté par une auréole claire formée autour de chaque puits, exprimé en mm et interprété en quatre niveaux d'activités selon Ponce et *al.* 2003 comme suit:

- (-) souche résistante $D < 8$ mm.
- (+) souche sensible $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$.
- (++) souche très sensible $15 \leq D \leq 19$ mm.
- (+++) souche extrêmement sensible $D \leq 20$ mm.

5.1. Activité antibactérienne

5.1.1. Test de sensibilité des bactéries aux extraits testés

Ci-dessous, sont présentés les résultats des zones d'inhibition obtenus sur gélose de Muller-Hinton (MH) pour MC et ME (Figures 33) (Figure 34) respectivement.

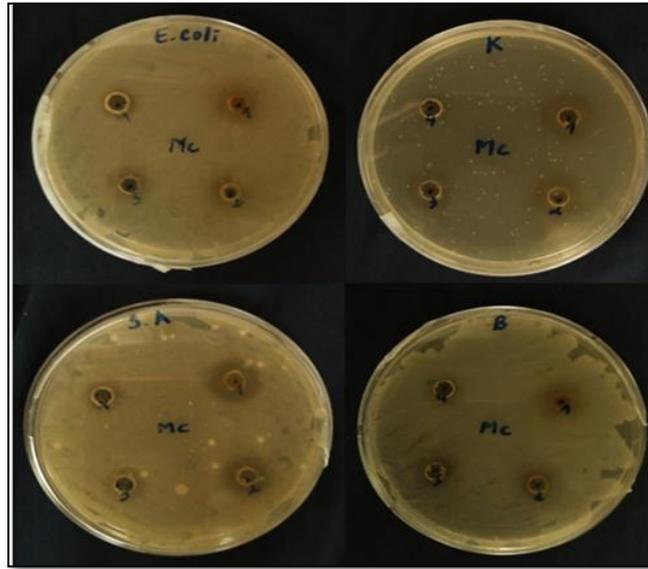


Figure 33: Illustration des résultats du test de diffusion en milieu gélosé des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait chloroformique (photos originales)

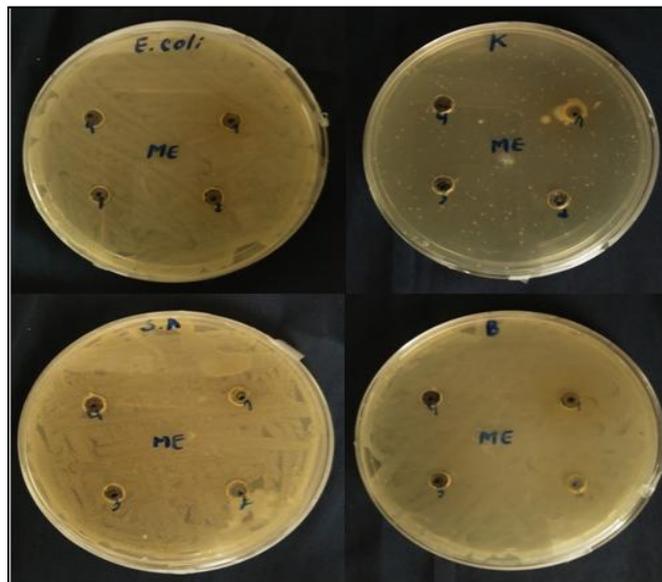


Figure 34: Illustration des résultats du test de diffusion en milieu gélosé des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanolique (photos originales).

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont résumés dans le tableau 16:

Tableau 16: Résultats du test antibactérien de l'extrait chloroformique et éthanolique

souches	Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait chloroformique				Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait éthanolique			
	Les différentes concentrations effectuées (mg/ml)							
	20	10	5	2,5	20	10	5	2,5
<i>E. coli</i>	14 +	13 +	12 +	11 +	0 -	0 -	0 -	0 -
<i>K</i>	15 ++	14 +	13 +	12 +	0 -	0 -	0 -	0 -
<i>S.A</i>	16 ++	15 ++	12 +	11 +	0 -	0 -	0 -	0 -
<i>B</i>	15 ++	14 +	13 +	12 +	0 -	0 -	0 -	0 -

(-) : résistante (+) : sensible (++) : très sensible

Selon le tableau ci-dessus, les souches bactériennes testées sont apparues sensibles à très sensibles vis-à-vis de l'extrait chloroformique de notre plante aux différentes concentrations effectuées. Cela montre clairement que cet extrait exerce une activité antibactérienne sur les quatre souches étudiées, avec un diamètre maximal d'inhibition de 16 mm pour *Streptococcus aureus*, 15 mm pour *klebsiella pneumoniae*, 15 mm pour *Bacillus subtilis* et 14 mm pour *E coli* à la concentration de 20 mg/ml. En effet, notre extrait chloroformique est avéré actif sur tous les germes testés. Cependant, l'extrait éthanolique n'a montré aucune activité antibactérienne vis-à-vis des quatre souches testées. Cela peut être expliqué par le fait que l'activité antibactérienne des extraits de la plante est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits y compris les flavonoïdes, les tanins et triterpènes ainsi que d'autre composés de nature phénolique ou groupes hydroxyles libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas et al. 1992; Marjori 1999).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être du à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srouf 2000).

A l'analyse des résultats du tableau 08, il ressort manifestement que la grande sensibilité des bactéries gram+ par rapport aux bactéries gram-, cette constatation pourrait s'expliquer par la nature ou la complexité de la structure et la nature des bactéries (gram- et gram+). En effet, la paroi des bactéries gram+ est presque exclusivement constituée de peptidoglycane. La

paroi des bactéries gram- est plus complexe, le peptidoglycane réduit en fine couche, est entouré par deux membranes. La membrane interne comporte majoritairement des phospholipides. Alors que, la membrane externe présente une face interne constituée de phospholipides et une face externe caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS). Le caractère hydrophile de LPS rend la membrane externe des bactéries gram- imperméables à la plupart des molécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des bactéries gram- (Onzo et al. 2015).

Sachant que l'extrait éthanolique de notre plante n'a enregistré aucune zone d'inhibition, les résultats obtenus par l'extrait chloroformique sont seuls récapitulés dans l'histogramme suivant:

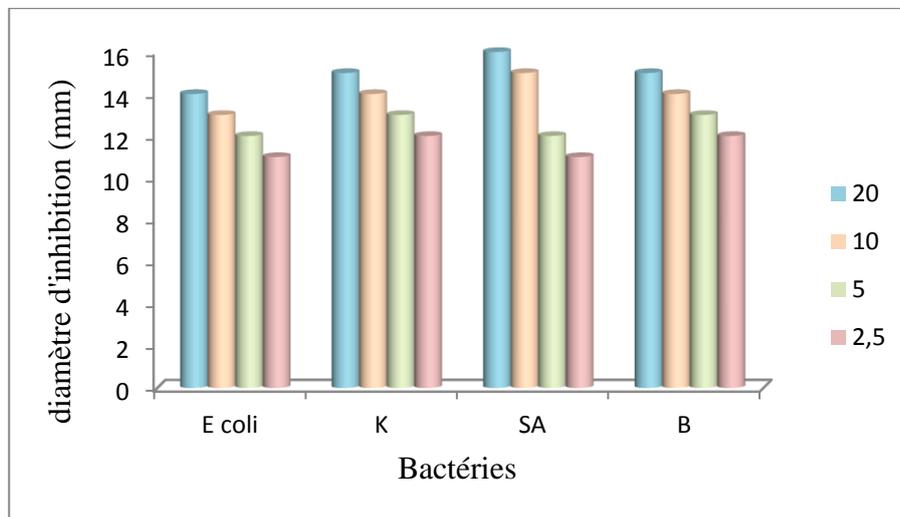


Figure 35: Zones d'inhibitions en mm des quatre souches bactériennes testées en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique.

L'examen de l'histogramme montre que la zone d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Autrement dit, l'extrait chloroformique a réussi à tuer les bactéries d'une manière dépendante de la concentration.

Sur le plan comparatif, nos résultats sont en bonne corrélation avec une étude antérieure faite par Al-taweil 2014 dans laquelle l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. peperita* présentaient une action antibactérienne contre *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus aureus* avec des diamètres d'inhibitions de l'ordre de 9,9; 9,3 et 6,8 mm respectivement pour l'extrait aqueux et de 12,4; 12,2 et 9,8 mm pour l'huile essentielle à la concentration de 100µg. Ce qui est moins performant que notre extrait chloroformique.

En outre, nos résultats sont en accord avec ceux mentionnés par Zaidi et Dahiya 2015 en Inde, qui ont montré que l'HE (huile essentielle) de *M. spicata* exerce une activité antibactérienne comparable à celle de l'extrait chloroformique de notre plante, avec un diamètre maximal d'inhibition de 14 mm pour *E coli*, 15 mm pour *Streptococcus aureus* et 12,7 mm pour *Klebsiella pneumoniae*.

A l'issue de cette étude, il ressort que notre plante serait douée d'une activité antibactérienne considérable vis-à-vis de toutes les souches testées. De façon générale, l'extrait chloroformique est avéré actif sur les bactéries gram+ plus que les bactéries gram-.

Enfin, il faut retenir que l'extrait chloroformique agit même à la plus faible concentration (2,5mg/ml), par conséquent notre plante étudiée possède une bonne activité antibactérienne (Onzo et *al.* 2015).

5.2. Activité antifongique

5.2.1. Test de sensibilité des souches fongiques aux extraits testés

Ci-dessous, sont présentés les résultats des zones d'inhibition obtenus sur les boîtes de MH pour chaque extrait (Figures 36) (Figure 37):

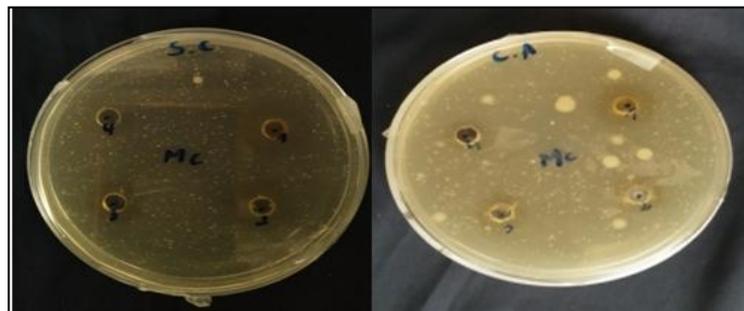


Figure 36: Illustration du test antifongique de l'extrait chloroformique (photos originale).

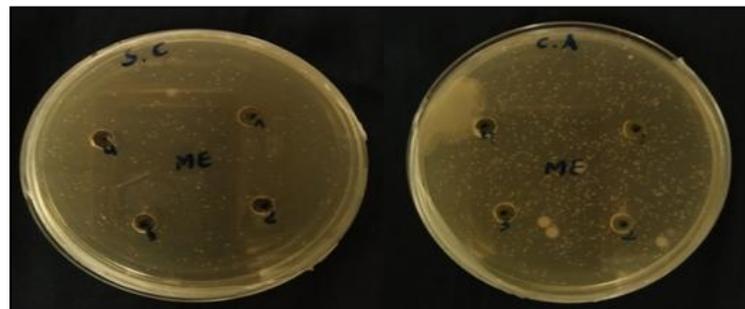


Figure 37: Illustration du test antifongique de l'extrait éthanolique (photos originale).

Les valeurs des diamètres d'inhibition mesurés à l'aide d'une règle au dos de la boîte de pétri pour les deux extraits apparaissent dans le tableau 17:

Tableau 17: Activité antifongique de l'extrait éthanolique et chloroformique sur les souches testées.

Micro-Organismes	DI (mm) de l'extrait chloroformique				DI (mm) de l'extrait éthanolique			
	Concentrations (mg/ml)				Concentration (mg/ml)			
	20	10	5	2,5	20	10	5	2,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17 ++	16 ++	14 +	12 +	0 -	0 -	0 -	0 -
<i>Candida albicans</i>	14 +	12 +	12 +	10 +	0 -	0 -	0 -	0 -

L'examen des résultats révèle que l'extrait chloroformique a une bonne activité antifongique contre les deux souches testées avec un diamètre maximal d'inhibition de 17 mm pour *Saccharomyces cerevisiae* et de 14 mm pour *Candida albicans* à la concentration de 2 mg/ml. Donc, les souches sont apparues sensibles à très sensibles vis-à-vis de cet extrait. Cependant, l'extrait éthanolique n'a montré aucune activité antifongique par rapport aux mêmes souches.

L'analyse de nombreux travaux a suggéré que l'activité antimicrobienne des extraits de plantes nécessitait dans la plupart des cas de fortes concentrations (Adejare et al. 2013; Bujiti et al. 2004). Ce qui laisse supposer probablement que les concentrations utilisées étaient faibles et expliqueraient l'absence d'activité chez l'extrait éthanolique que nous avons utilisé.

5.2.2. Relation concentration-activité antifongique des extraits

Les résultats obtenus par l'extrait chloroformique nous permettent de comparer la sensibilité du champignon et de la levure vis-à-vis de cet extrait.

Les résultats sont mentionnés dans les figures 38 et 39:

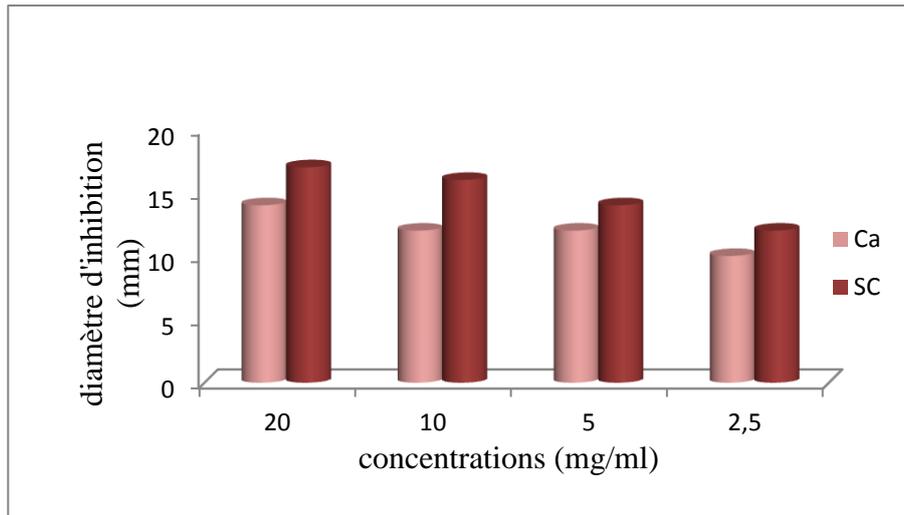


Figure 38: Zones d'inhibitions en mm des souches fongiques en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique

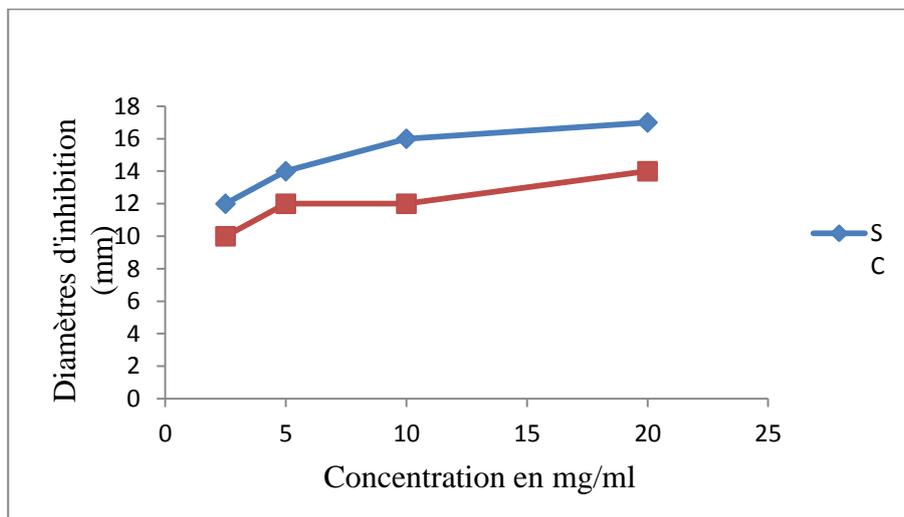


Figure 39: Diamètres d'inhibition des souches testées en fonction des concentrations de l'extrait chloroformique

D'après les figures ci-dessous, nos résultats montrent que l'extrait chloroformique a une bonne activité antifongique sur les germes testés selon une relation dose –réponse. Autrement dit : plus on augmente la concentration de l'extrait, plus le diamètre d'inhibition augmente et par conséquent le pouvoir antifongique augmente.

La comparaison des courbes de *Saccharomyces cerivisiae* et *Candida albicans* mettent en évidence le constat que le champignon *Condida albicans* est moins sensible a l'extrait chloroformique par rapport a la levure *Saccharomyces cerivisiae*. Ceci pourrait s'expliquer par

le fait que la souche *CA* ait développé des mécanismes de résistance aux molécules antifongiques présentes dans l'extrait chloroformique. Parmi ces mécanismes la capacité de *CA* à switcher ou capacité à changer de phénotype " Switch phénotypique " (Millon et al. 2002).

Effectivement, de nombreux travaux ont révélé que la variabilité phénotypique pourrait être une stratégie mise en place par certains microorganismes pour échapper aux mécanismes immunitaires de l'hôte (Yala et al. 2016).

Ainsi, la facilité avec laquelle *CA* peut changer de phénotype peut être en relation avec sa résistance à l'extrait éthanolique et sa moindre sensibilité à l'extrait chloroformique. Les effets des espèces de *Mentha* sur les champignons ont également été testés dans diverses études. Hofling et al. 2014 ont évalué 10 espèces de *Candida* qui étaient sensibles à l'extrait au méthanol de *M. piperita*. Cette espèce était également efficace contre *C. albicans* et contre *Saccharomyces cerevisiae*, ce qui confirme bien la validité des résultats obtenus par l'extrait chloroformique de notre plante.

L'activité antimicrobienne de notre plante vis-à-vis des souches étudiées est due d'un côté, à la présence chez notre plante des principales familles des composés chimiques susceptibles de conférer les propriétés antimicrobiennes à une plante qui sont notamment les dérivés phénoliques et les flavonoïdes. Et d'un autre côté, à l'effet antimicrobien du menthol qui pourrait avoir entraîné, au moins partiellement une perturbation de la fraction lipidique de la membrane plasmique du microorganisme entraînant des altérations de la perméabilité de la membrane et une fuite des matériaux intracellulaires. (Merghache et al. 2012; Mikicienne et al. 2011; Rana et al. 1997).

Conclusion

Conclusion générale et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales et aromatiques constituent un vrai patrimoine pour l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée durant ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribués à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par les plantes non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicaux tels que les antioxydants. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des molécules chimiques de synthèse.

Dans l'optique de valider l'utilisation traditionnelle des espèces végétales du genre *Mentha*, de chercher des alternatives aux substances chimiques de synthèse, notre travail s'est articulé autour de l'évaluation des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, anticholinésterases, la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux d'une plante appartenant au genre *Mentha* en se basant en premier lieu sur l'utilisation de ses espèces en médecine traditionnelle.

En effet, les tests antibactériens de l'extrait ethanologique et chloroformique réalisés in vitro par la méthode de diffusion sur gélose sur quatre souches bactériennes (*E.coli*, *Streptococcus aureus*, *klebsiella pneumonia* et *Bacillus subtilis*) et les tests antifongiques sur un champignon (*Candida albicans*) et une levure (*Saccharomyces cerivisiae*) ont démontré que l'extrait chloroformique s'est avéré actif sur toutes les souches testées. En revanche, l'extrait ethanologique n'avait aucune activité antimicrobienne.

Ainsi, l'étude de l'activité antioxydante en utilisant trois méthodes complémentaires (le test de DPPH, ABTS⁺, CUPRAC) a démontré que la plante étudiée est dotée d'un pouvoir antioxydant considérable probablement due à sa richesse en polyphénols et flavonoïdes, ceci est confirmé par l'évaluation de la teneur en ces deux composés donnant des valeurs assez

importantes. Ce potentiel antioxydant est plus intense avec l'extrait chloroformique qui a une grande teneur en polyphénols.

Enfin, les deux extraits de la plante étudiée n'avaient pas pu inhiber l'enzyme acétylcholinestérase. Par conséquent, notre plante ne possède aucune activité enzymatique anticholinésterase.

Ces résultats apportent des éléments de validation scientifique de l'utilisation traditionnelle des membres de la famille des *Lamiaceae*, plus particulièrement des espèces du genre *Mentha*.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées:

- ✓ Elargir le panel des activités antimicrobiennes et antioxydantes in vitro et in vivo.
- ✓ Elargir le travail pour d'autres activités biologiques tel que: l'activité anti-inflammatoire, l'activité cytotoxique, antitumorale et hépatoprotectrice.
- ✓ Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.

Références bibliographiques

A

- Abdel-Hameed E. S., Salman M. S., Fadl M. A., Elkhateeb A., Hassan M. M. (2018).** Chemical composition and biological activity of *Mentha longifolia L.* essential oil growing in Taif, KSA extracted by hydrodistillation, solvent free microwave and microwave hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 21 (1): 1-14.
- Adejare O. Y., Oduyebo O. O., Oladele R. O., Nwaokorie F. O., Ogunsola F. T. (2013).** *In vitro* antifungal effect of *Garcinia Lola* and Garlic (*Alliums sativu*) on vaginal isolates of *candida*. *African journal of clinical and experimental microbiology.* 14 (3): 140-145.
- Adewusi E. A., Moodley N., Steenkamp V. (2010).** Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: A review. *African Journal of Biotechnology.* 9(49): 8257-8276.
- Ali-Shtayeh M. S., Jamous R. M., Abu Zaitoun S Y., Qasem I. B. (2014).** *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease.* 4(9): 381-400.
- Al-taweil H. I. (2014).** Antimicrobial effect of mint essential oils on some pathogenic bacteria. *International Journal of Life Sciences Research.* 2(4): 90-93.
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K. M., Özyürek M., Güçlü K. (2013).** Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 85 (5): 957-998.
- Apak R., Güçlü K., Ozyürek M., Karademir S. E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 7970-798.
- Apel K., Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology.* 55: 373-399.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). (2002).** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants, APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399-436.
- Ayoola G. A., Coker H. A. B., Adesegun S. A., Adepoju-Bello A. A., Obaweya K., Ezennia E. C., Atangbayila T. O. (2008).** Phytochemical screening and antioxidant activities of some

selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (3): 1019-1024.

B

- Baba S. A., Malik S. A. (2015).** Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*. 9 (4): 449-454.
- Bacharat S. (2015).** Le pouvoir antioxydant des additifs phytogéniques. *Biomin* (ed.). Austria. P03.
- Bachir Bey M., Louaileche H., Mouhoubi Z. (2014).** Antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon Esculentuml.*) varieties grown in Algeria. *Journal of Food Technology Research*. 1 (2): 133-145.
- Bahadori M. B., Zengin G., Bahadori S., Dinparast L., Movahhedine N. (2018).** Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia var.calliantha (Stapf) Briq.*). *International Journal of Food Properties*. 21 (1): 198-208.
- Barchan A., Bakkalil M., Arakrak A., Pagán R., Laglaoui A. (2014).** The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3 (11): 399-412.
- Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- Bellassoued K., Ben Hsouna A., Athmouni K., Van Pelt J., Makni Ayadi F., Rebai T., Elfeki A. (2018).** Protective effects of *Mentha piperita L.* leaf essential oil against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Lipids in Health and Disease*. 17 (9): 1-14.
- Benabdallah A., Rahmoune C., boumenjel M., Aissi O., Messoud C. (2016).** Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (*Lamiaceae*) from Northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (9): 760-766.
- Benhamou N. (2009).** La résistance chez les plantes. *Lavoisier* (ed.). Paris. P376.
- Beserra Almeida M. M., Machado de Sousa P. H., Campos Arriaga A. M., Matias do Prado G., De Carvalho Magalhães E.M., Arraes Maia G., Gomes de Lemos T. L. (2011).** Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44: 2155–2159.

- Bimakr M., Rahman R. A., Ganjloo A., Taip S. F., Liza M. S., Sarker M. Z. I. (2011).** Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves by using response surface methodology. *Food Bioprocess Technol.* 89: 67-72.
- Biyiti L. F., Meko'o D. L., Tamze V., Amvam Zollo P. H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm Méd Trad Afr.* 13: 11-20.
- Blois M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200.
- Bo L., Philip D. C., Richard G. O., Gemma L. C. B., Chun-Lei X., Zhong-Hui M., Yun-Hong T., Dian-Xiang Z. (2016).** A large-scale chloroplast phylogeny of the *Lamiaceae* sheds new light on its subfamilial classification. *Scientific Reports.* 6: 1-18.
- Bohn T. (2014).** Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr. Rev.* 72: 429-452.
- Boizot N., Charpentier J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra.* Vol: 79-82.
- Božović M., Pirolli A., Ragno R. (2015).** *Mentha suaveolens* ehrh. (*Lamiaceae*) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. *Molecules.* 20: 8605-8633.
- Brahmi F., Hadj-Ahmed S., Zarrouk A., Bezine M., Nury T., Madani K., Chibane M., Vejux A., Andreoletti P., Boulekbache-Makhlouf L., Lizard G. (2017).** Evidence of biological activity of *Mentha* species extracts on apoptotic and autophagic targets on murine RAW264.7 and human U937 monocytic cells. *Pharmaceutical Biology.* 55 (1): 286-293.
- Brahmi F., Khodir M., Chibane M., Pierre D. (2017).** Chemical composition and biological activities of mentha species. *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature.* 47-79.
- Bravo L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
- Bray L. (2005).** Phylogénie des Angiospermes. [http://www. Botanique.org](http://www.Botanique.org). consulté le 25/04/18.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Médicales Internationales-Tec et Doc* (ed.). Paris. 70-401.

Buer C. S., Imin N., Djordjevic M. A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52 (1): 98–111.

C

Carlier-Loy P. (2015). *Mentha spicata* : Description et utilisations en thérapeutique et en agriculture comme antigerminatif sur la pomme de terre. Thèse de doctorat. Université de Picardie Jules Verne. France.

Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10 (3): 178-182.

Chavan B. B., Gadekar A. S., Mehta P. P., Vawhal P. K., Kolsure A. K., Chabukswar A. R. (2016). Synthesis and medicinal significance of chalcones: A review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 6 (56): 01-07.

Cirlini M., Mena P., Tassotti M., Herrlinger K A., Nieman K M., Dall'Asta C., Del Rio D. (2016). Phenolic and volatile composition of a dry spearmint (*Mentha spicata L.*) extract. *Molecules*. 21 (1007): 1-15.

Couplan F. (2012). Les plantes et leurs noms: Histoires insolites. Quae (ed.). France. P 224.

De Laet Santana P., Feiria S. N. B., Hofling G. F. (2016). Medicinal plants as a source of new therapeutic products: Genus *Mentha* and the potential antimicrobial activity of extracts and essential oils. *Current Traditional Medicine*. 2: 94-114.

D

Defraigne J. O., Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: Mythes et réalités. *Rev Med Liège*. 63: 10-19.

Dehshahri S., Wink M., Afsharypuor S., Asghari G., Mohagheghzadeh A. (2012). Antioxidant activity of methanolic leaf extract of *Moringa peregrina* (forssk.) fiori. *Research Pharmaceutical Sciences*. 7(2): 111–118.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J. P. E., Tognolini M., Borges G., Crozier A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants Redox Signal*. 18: 1818-1892.

- Derouiche S., Zeghib K., Gharbi S., Khelef Y., Feriani A. (2017).** Protective effects of *Aristolochia longa* and *Aquilaria malaccensis* against lead induced acute liver injury in rats. *Journal of Acute Disease*. 6(5): 193-197.
- Derwich E. R., Chabir R., Taouil O., Senhaji. (2011).** *In-vitro* antioxidant activity and GC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (*Lamiaceae*) from Morocco. *Int. J. Pharmaceut. Sci. Drug Res.* 3: 130-136.
- Deschamps C., Zanatta J. L., Bizzo H. R., Oliveira M. C., Roswalka L. C. (2008).** Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Ciênc. Agrotec.* 32: 725-730.
- Doukani K., Tabak S., Derriche A., Hacini Z. (2014).** Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement*. 10: 37-49.
- Droge W. (1999).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82 (1): 47-95.
- Ducerf G. (2014).** L'encyclopédie des plantes bio-indicatrices alimentaires et médicinales: Guide de diagnostic des sols. Promonature (ed.). France. P352.
- Dupond F., Guignard J. L. (2012).** Botanique: Les familles de plantes. Elsevier Masson (ed.). Paris. P300.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- Ertas A., Gören A. C., Haşimi N., Tolan V., Kolak U. (2015).** Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory and antimicrobial properties of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* and its secondary metabolites. *Records of natural products*. 9 (1): 105-115.

E

- Essawi T., Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Ethnopharm.* 70: 343-349.
- Evans P., Halliwell B. (1999).** Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 884: 19-40.

F

- Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en Chimie*. 108-115.
- Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr. Mémoire des Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus L.** 64: 390-396.
- Ferhat M.** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques des espèces : *Mentha aquatica*, *Stachys guyoniana* et *Thymus dreatensis (Lamiaceae)*. Thèse de doctorat. Algérie.
- Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006).** Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4): 327-58.
- Flora S. J. S. (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long.* 2 (4): 191-206.
- Folin O., Ciocalteu V. (1927).** On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Biochemical Laboratory of Harvard Medical School.* 73: 627-650.
- Foti M. C., Daquino C., Mackie L. D., DiLabio G. A., Ingold K. U. (2008).** Reaction of phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Kinetics and DFT calculations applied To determine ArO-H bond dissociation enthalpies and reaction mechanism. *The Journal of Organic Chemistry.* 73 (23): 9270-9282.
- Fournier P. V. (2010).** Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Paul Lechevalier (ed.). Paris. P. 623-627-628.
- François J., Gaudry M., Part R. (2012).** Biologie végétale: Croissance et développement. Dunod (ed.). Paris. P217-218.

G

- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèce réactive de l'oxygène. *L'actualité Chimique.* 91-96.
- Gharib F. A. E. L., Da Silva J. A. T. (2013).** Composition, total phenolic content and antioxidant activity of the essential oil of four *lamiaceae* herbs. *Med. Arom. Plant Sci. Biotechnol.* 7: 19-27.

- Ghazghazi H., Aouadhi C., Maaroufi A., Hasnaoui B. (2013).** Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du Nord de Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim.* 25 (73): 37-41.
- Ghedira K. (2005).** Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie.* 3 (4): 162-169.
- Gilly G. (2005).** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse: Botanique-Culture-Chimie-Production et marché. Harmattan (ed.). P418.
- Gonçalves R. S.; Battistin A.; Pauletti G.; Rota L.; Serafini L. A. (2009).** Propriedades antioxydantes de óleos essenciais de espécies de *Mentha* evidenciadas por métodos eletroquímicos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.* 11 (4).
- Gougoulis N. (2014).** Comparative study on polyphenols and antioxidant activity of some herbs and species of the *Lamiaceae* and *Ubelliferae* family. *Antioxidants in biological systems.* 37 (2): 512-521.

H

- Halliwell B. (1999).** How to characterize a biological antioxidant. *Free RadicRes Commun.* 9: 1-32.
- Halliwell B. (2006).** Reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology.* 141: 312-322.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 13 (10): 572-584.
- Heller R., Esnault R., Lance C. (2011).** *Physiologie végétale.* Dunod (ed.). Paris. P323.
- Hilton J. W. (1989).** Les antioxydants rôles, types et nécessites dans les aliments pour animaux de compagnie. *Can Vet.* 30: 835-837.
- Höfling J. F, Anibal P. C, Obando-Pereda G. A, Peixoto I. A. T., Furletti V. F., Foglio M. A. B., Gonçalves R. B. (2010).** Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz J Biol.* 70 (4): 1065-1068.

I

Ibrahim A. Y., Youness E. R., Shalaby A. S., Magd El-Din M. (2016). Anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Mentha longifolia* for treating Alzheimer disease. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre*. 8 (7): 34-39.

Ichai C., Quintard H., Orban J. C. (2011). Désordres métaboliques et reanimation. Springer. 427-439.

J

Jakubczyk M., Michalkiewicz S. (2018). Electrochemical behavior of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in acetic acid solutions and their voltammetric determination in pharmaceutical preparations. *International Journal of Electrochemical Science*. 13: 4251-4266.

K

Khennouf S., Benchiekh D., Djidel S., Dahamna S., Smain A., Charef N., Baghiani A., Harzallah D., Arrar L. (2013). Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium L.* and *Matricaria chamomilla L.* *Pharmacognosy Communications*. 3 (2): 36-40.

Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol.* 30: 620-650.

Kokkini S., Karousou R., Hanlidou E. (2003). Herbs | Herbs of the *Labiatae*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 3082-3090.

Kovacic P., Pozos R. S., Somanathan R., Shangari N., O'Brien P. J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 12 (22): 2601-2623.

Krzyzanowska J., Janda B., Pecio L., Stochmal A., Oleszek W., Czubachaa., Przybys M., Doroszewska T. (2011). Determination of polyphenols in *Mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and *In Vitro* plant samples using UPLC-TQ-MS. *Journal of AOAC International*. 94 (1): 43-50.

L

- Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* 30: 1076-1081.
- Levrant J., Iwase H., Shao Z. H., Vanden H. T. L., Schumacker P. T. (2003).** Cell death during ischemia: Relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: 549-58.

M

- Maclaren D. (2007).** Advances in sports and exercise science series. In Close GL and Mc Ardle F, eds. Nutrition and sport. Antioxidants and free radicals. Elsevier's Health Sciences Rights Department. 153-175.
- Mamadaliyeva N. Z., Akramov D., Ovidi E., Tiezzi A., Nahar L., Azimova S. S., Sarker S. D. (2017).** Aromatic medicinal plants of the *Lamiaceae* family from Uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. *Academic Editor.* 4(1): 8.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2003).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79: 727-47.
- Marjorie M. C. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12 (4): 564-582.
- Martin P. (2014).** Les familles de plantes à fleurs d'Europe: Botanique systématique et utilitaire. Presses Universitaires de Namur (ed.). Belgique. P289.
- Masashi H. (2014).** Chapter 15-Antioxidant properties of wheat bran against oxidative stress. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health.* 181-199.
- Merghem R. (2009).** Les éléments de biochimie végétale. Bahaeddine (ed.). Algerie. P171.
- Merouane A., Noui A., Medjahed H., Nedjari benhadj ali K., Saadi A. (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8 (4): 1865-1870.
- Mickienė R., Ragažinskienė O., Bakutis B. (2011).** Antimicrobial activity of *Mentha arvensis L.* and *Zingiber officinale R.* essential oils. *Biologija.* 57 (2): 92-97.

- Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84: 407-412.
- Milon L., Piarroux R., Monod M., Meillet D. (2002).** Physiopathologie de la candidose oropharyngée au cours de l'infection par le VIH. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 32 (12): 696-703.
- Mohammedi Z. (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en biologie. Université Abou Bekr Belkaid. Algérie.
- Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2): 211-219.
- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72: 145-171.
- Msaada K., Ben Jemia M., Salem N., Bachrouch O., Sriti J., Tammar S., Bettaieb I., Jabri I., Kefi S., Limam F., Marzouk B. (2017).** Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2): S3176–S3183.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A. M., V. Böhm V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 43 (6): 992-999.

N

- Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. (2008).** Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (3): 203-209.
- Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Norren K., Leeuwen P. A. M. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74: 418–25.

O

- Onzo C. F., Azokpota P., Dah-Noulessounon D., Lehmane Toure H., Adjatni A., Baba-Moussa L. (2015).** Evaluation de l'activité antimicrobienne de quatre feuilles utilisées comme emballages dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*. 95: 9015-9027.
- Orhan I., Kartal M., Kanc Y., Senner B. (2004).** Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 63: 547-553.
- Özyürek M., Kubilay G., Tütem E., Kevser S. B., Erol E., S. Esin Ç., Baki S., Yildiz L., Karaman S., Apak R. (2011).** A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*. 3 (11): 2439.

P

- Pan L., Zhe-Chen Q., Lu-Xian L., Ohi-T T., Joongku L., Tsung-Hsin H., Cheng-Xin F., Kenneth M., Cameron., Ying-Xiong Q. (2017).** Molecular phylogenetics and biogeography of the mint tribe *Elsholtzieae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*), with an emphasis on its diversification in East Asia. *Scientific Reports*. 7: 1-12.
- Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016).** Flavonoids: An overview. *Journal of nutritional science*. 5 (47): 1-15.
- Pandini J. A., Pinto F. G. S., Scur M. C., Santana C. B., Costa W. F., Temponi L. G. (2018).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Brazilian Journal of Biology*. 78 (1): 53-60.
- Pękal A., Pyrzyńska K. (2014).** Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 7: 1776–1782.
- Pereira O. R., Cardoso S. M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols. *Current Analytical Chemistry*. 9: 382-396.
- Pon Velayutham A. B., Dongmin L. (2009).** Chapter 18-Flavonoids and cardiovascular health. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*. 4: 371-392.
- Ponce A G., Fritzb R., Del Valle C., Roura S R. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 36: 679-684.

Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.

Q

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre National de la Recherche Scientifique (ed.). Paris. P1170.

R

Race S. (2009). Antioxidants The truth about BHA, BHT, TBHQ and other antioxidants used as food additives. Tigmor Books (ed.). P07

Ramasubramania R. (2012). Medicinally Potential Plants of *Labiatae (Lamiaceae)* Family: An overview. *Research Journal of Medicinal Plants*. 6 (3): 203-213.

Rameshwar N., Ismail R. B., Chen Y., Sasidharan S., Kumar P. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of the crude methanolic extracts of *Mentha spicata*. *Journal of Phytology*. 4 (1): 13-18.

Raven., Evert., Eichhorn. (2014). Biologie végétale. De boeck (ed.). P30.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applyilg an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26 (9/10): 1231-1237.

Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux: Physiologie et biochimie. Presses Phytochimiques et Universitaires Romandes. France. P526.

Rizzo A. M., Berselli P., Zava S., Negroni M., Carsetto P., Berra B. (2011). Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol*. 698: 52-67.

Rodríguez-Vaquero M. J., Alberto M. R., Manca de Nadra M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18 (2): 93-101.

Roginsky V., Lissi E. A. (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92 (2): 235-254.

Rojas R. R., Charlet L. D. Leopold R. A. (1992). A differential scanning calorimetric analysis of inoculative freezing in an insect. *Cryo. Lett*. 13: 355-362.

S

- Samarth R. M., Panwar M., Kumar M., Soni A., Kumar an A., Kumar A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chem.* 106: 868-873.
- Santhakumar A. B., Battino M., Alvarez-Suarez J. M. (2018).** Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology.* 113: 49-65.
- Senejoux F. (2011).** Études phytochimique et pharmacologique de *Ziziphora clinopodioides* (*Lamiaceae*), *Nitraria sibirica* (*Nitrariaceae*) et *Echinops integrifolius* (*Asteraceae*), plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté.
- Sevindik M. (2018).** Pharmacological properties of *Mentha Species*. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy.* 7 (1): 1-4.
- Shang H. M., Zhou H. Z., Yang J. Y., Li1 R., Song H., Wu H. X. (2018).** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE* 13(2): 1-12.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16: 144-151.
- Stalikas C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30: 3268-3295.
- Sutour S. (2010).** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de doctorat. Université de Corse Pascal Paoli. France.

T

- Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4): 1111-1117.

Tamokou J. D. D., Mbaveng À., Kuete V. (2017). Chapitre 8-Activités antimicrobiennes des épices médicinales et légumes africains. *Épices médicinales et légumes d'Afrique*. 207-237.

Tejero J., Gayoso S., Caro I., Cordoba-Diaz D., Mateo J., Basterrechea J. E., Gurbés T., Jiménez P. (2004). Comparative analysis of the antioxidant and free-radical scavenging activities of different water-soluble extracts of green, black and oolong tea samples. *Food and Nutrition Sciences*. 5 (22): 2157-2166.

Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., Ulubelen A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103: 816-822.

V

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266 (1/2): 37-56.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39 (1): 44-84.

Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Kindl M., Vladić J., Lower-Nedza A. D., Brantner A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the *Lamiaceae* Family. *Molecules*. 19: 767-782.

Y

Yala J. F., Ntsameso-mve-mba V., Azzizet issembe Y., Lepengue N. A., Souza A. (2016). Evaluation in vitro de l'extrait aqueux d'*Eryngium foetidum* récolté dans la ville de Fraceville. *Journal of Applied Biosciences*. 103: 9886-9893.

Z

Zaabat N. (2014). Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de deux espèces de la famille des Lamiacées: *Marrubium deserti* de Noé. et *Phlomis bovei* de Noé. Thèse de doctorat. Algérie.

- Zaidi S., Dahiya P. (2015).** *In vitro* antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. International Food Research Journal. 22 (6): 2440-2445.
- Zaprozhet O. A., Krushynska O. A., Lipkovska N. A., Barvinchenko V. N. (2004).** A new test for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (1): 21-25.

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude de quelques activités biologiques d'une espèce végétale appartenant au genre *Mentha*. Ainsi que l'évaluation de sa teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux pour mieux apprécier ses propriétés biologiques.

L'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, le test à ABTS⁺ et CUPRAC a montré que l'extrait chloroformique manifeste un pouvoir antioxydant plus grand que l'extrait éthanolique avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 31.23±0.09µg/ml, 16.6±1.03µg/ml et 43.43±0.00µg/ml pour le test DPPH, ABTS⁺ et CUPRAC respectivement. Ainsi, le même constat a été fait lors de l'évaluation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux où l'extrait chloroformique a enregistré une teneur en flavonoïdes de 121.25µg EQ/mg d'extrait sec et une teneur en polyphénols de 213.16 µg EAG/mg d'extrait sec.

Pour l'activité enzymatique, les deux extraits n'ont montré aucune activité anticholinestérase.

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose pour les microorganismes testés (*E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerivisiae*). Les résultats mettent en évidence que l'extrait chloroformique a manifesté une activité modérée vis-à-vis de tous les microorganismes testés, sa meilleure activité antibactérienne a été observée chez *Streptococcus aureus* avec un diamètre de 16 mm, tandis que sa meilleure activité antifongique a été constatée chez *Saccharomyces cerivisiae* avec un diamètre de 17mm. En revanche, l'extrait éthanolique n'a montré aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de tous les microorganismes étudiés.

Mots clés: *Mentha*, polyphénols, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité anticholinestérase.

Abstract

This work focused on the study of some biological activities of a plant specie belonging to the genus *Mentha*. As well as the evaluation of its content of polyphenols and total flavonoids to better appreciate its biological properties.

The antimicrobial effect was determined by the agar diffusion method for the microorganisms tested (*E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerivisiae*). The results show that the chloroform extract showed a moderate activity against all microorganisms tested, its best antibacterial activity was observed in *Streptococcus aureus* with a diameter of 16 mm, while its best antifungal activity has been observed. found in *Saccharomyces cerivisiae* with a diameter of 17mm. On the other hand, the ethanolic extract showed no antimicrobial activity with respect to all the microorganisms studied.

The evaluation of the antioxidant activity of the two extracts by the DPPH free radical scavenging method, the ABTS + and CUPRAC test showed that the chloroform extract exhibits a greater antioxidant capacity than the ethanolic extract with values of IC₅₀ of the order of $31.23 \pm 0.09 \mu\text{g} / \text{ml}$, $16.6 \pm 1.03 \mu\text{g} / \text{ml}$ and $43.43 \pm 0.00 \mu\text{g} / \text{ml}$ for the DPPH, ABTS + and CUPRAC test respectively. Thus, the same observation was made during the evaluation of the content of total polyphenols and flavonoids where the chloroformic extract recorded a flavonoid content of $121.25 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$ of solids and a polyphenol content of $213.16 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ dry extract.

For the enzymatic activity, both extracts showed no anticholinesterase activity.

Key words: *Lamiaceae*, *Mentha*, polyphenols, flavonoids, antimicrobial activity, antioxidant activity, anticholinesterase activity.

ملخص

هذا العمل يتمحور حول دراسة بعض الأنشطة البيولوجية لنبته تنتمي لنوع *Mentha* بالإضافة إلى تقييم محتواها من حيث البوليفينول و الفلافونويد الكليين لتقدير خصائصها البيولوجية بشكل أدق.

التأثير المضاد للميكروبات تم تقديره بطريقة الإنتشار على جيلوز (Mueller-Hinton) على الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها:

(*E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerivisiae*).

بينت النتائج أن مستخلص الكلوروفورم أظهر نشاطا معتبرا بالنسبة لجميع الكائنات الدقيقة التي تم اختبارها, حيث لوحظ أفضل نشاط بكتيري له بالنسبة للبكتيريا *Streptococcus aureus* أين سجل قطر 16 ملم. في حين أن أفضل نشاط له مضاد للفطريات سجل بالنسبة للخميرة *Saccharomyces cerivisiae* بقطر 17 ملم. من ناحية أخرى, لم يظهر المستخلص اللايثانولي أي نشاط مضاد للميكروبات بالنسبة لجميع الكائنات الحية الدقيقة التي تمت دراستها.

تقدير النشاط المضاد للأكسدة لكل من المستخلصين بطريقة الأسر للجذور الحرة DPPH, اختبار ABTS و CUPRAC أظهر أن مستخلص الكلوروفورم لديه نشاط مضاد للأكسدة أكبر من نشاط المستخلص الإيثانولي بقيم ($IC_{50}=31.23\pm 0.09$), ($IC_{50}=16.6\pm 1.03$), ($IC_{50}=43.43\pm 0.00$) بالنسبة لاختبار DPPH, ABTS و CUPRAC على التوالي. نفس الملاحظة ظهرت بالنسبة لتقييم محتوى النبتة من حيث البوليفينول و الفلافونويد الكليين, حيث أعطى مستخلص الكلوروفورم كمية قدرت بـ $121.25 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$ من محتوى الفلافونويد و

$213.16 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ من محتوى البوليفينول.

بالنسبة للنشاط الإنزيمي, لم يظهر كل من المستخلصين أي نشاط مضاد للكولين استيراز.

الكلمات المفتاحية: *Lamiaceae*, *Mentha*, بوليفينول, فلافونويد, نشاط مضاد للميكروبات, نشاط مضاد للأكسدة, نشاط مضاد للكولين استيراز.

Année universitaire : 2017/2018

SAADOUN Sara Racha
Présenté par : SAIFI Ines
ZIANE Meroua

Evaluation de l'activité biologique des extraits d'une plante algérienne appartenant au genre *Mentha*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master 2 en Biochimie Appliquée

Ce travail a porté sur l'étude de quelques activités biologiques d'une espèce végétale appartenant au genre *Mentha*. Ainsi que l'évaluation de sa teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux pour mieux apprécier ses propriétés biologiques.

L'évaluation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux a permis de constater une richesse des deux extraits en ces métabolites. De plus, l'extrait chloroformique ayant des teneurs plus élevées. L'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, le test à ABTS⁺ et CUPRAC a montré que les deux extraits ont une capacité antioxydante. De plus l'extrait chloroformique manifeste un pouvoir antioxydant plus grand que l'extrait ethanolique.

Pour l'activité enzymatique, les deux extraits n'ont montré aucune activité anticholinestérase.

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose pour les microorganismes testés (*E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*). L'extrait chloroformique a présenté une activité modérée vis-à-vis de tous les microorganismes testés, particulièrement *Streptococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae*. En revanche, l'extrait ethanolique n'a montré aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches étudiées.

Mots clés : *Mentha*, polyphénols, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité anticholinestérase.

Laboratoire de recherche :

Jury d'évaluation :

Président du jury : MAAMERI Z. (Maitre de conférences A-UFM Constantine1)

Rapporteur : SEMRA I. (Maitre assistante A-UFM Constantine1)

Examineur : MADI A. (Maitre de conférences B- UFM Constantine1)

Date de soutenance : 02/07/2018