

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Extraction, analyse et évaluation de l'activité antioxydante et
antibactérienne des polyphénols de la menthe poivrée**

Présenté par :

M^{lle} : AMAROUCHE Nawal

M^{lle} : AMOUCHI Farida

Soutenu publiquement, le 01/07/2018, devant le Jury composé de :

Mme BELMAHDI	Lila	MAA UMMTO	PRESIDENTE.
Mr RAHAL	Foudil	MAA UMMTO	EXAMINATEUR.
Mr LAYEB	Hatem	MAA UMMTO	EXAMINATEUR.
Mr BENCHOUAK	Mounir	MAA UMMTO	ENCADREUR.
Mr ABDOUN	Amar	Pharmacien microbiologiste	CO-ENCADREUR.
		CHU T-O	

Liste des tableaux

Tableau1 : Principales classes des acides phénoliques	6
Tableau2 : Principale classe des flavonoïdes	7
Tableau3 : principales méthodes d'extraction des polyphénols	9
Tableau4 : Les principales espèces réactives de l'oxygène	10
Tableau5 : solution à différentes concentration préparé de l'extrait éthanolique	20
Tableau6 :Les tests complémentaire	24
Tableau 7 : Corrélation entre sensibilité du germe et taille de la zone d'inhibition	26
Tableau 8 : Préparation des différentes dilutions de l'extrait (méthanolique et DMSO)	27
Tableau 9 : Rendement d'extraction de la partie arienne de la menthe poivrée	28
Tableau 10 : résultats des tests chimiques d'identification des constituants de l'extrait	28
Tableau 11 : composition de l'extrait des parties aériennes de la menthe poivrée en composés phénoliques.....	29
Tableau 12 : Rapport frontaux et couleur des taches avant et après révélation par l'I ₂	30
Tableau 13 : Les différentes valeurs de pics du spectre IR.....	32
Tableau 14 : Résultat de l'activité anti radicalaire de l'extrait vis-à-vis de H ₂ O ₂	32
Tableau 15 : Evaluation de l'activité antioxydante par les différents tests des extraits bruts éthanoliques de l'espèce étudié.....	32
Tableau 16 : Caractère des souches bactériennes sensibles étudiées	33
Tableau 17 : Activité antibactérienne des deux extraits sur le milieu MH	34
Tableau 18 : Les résultats de CMI pour les germes testés	35
Tableau 19 : résultat de la CMF.....	36
Tableau 20 : Rapport CMF/CMI.....	36

Liste des figures

Figure 1 : Aire de répartitions de la menthe par le monde (2007)	2
Figure 2 : la menthe poivrée	3
Figure3 : morphologie de la menthe poivrée	4
Figure 4 : Structure du noyau phénol	6
Figure 5 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes.....	7
Figure 6 : Structures de l'hydroxytyrosol (a)et du tyrosol (b)	8
Figure 7 : structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un gallo tanin	8
Figure 9 : Protocole d'extraction des phénols totaux de la menthe poivrée.....	15
Figure10 : Principe de la réduction du réactif de Folin Cioecalteu.....	18
Figure 11 : Structure chimique du radical DPPH [·] et de sa forme réduite.....	22

Abréviations

% : Pourcentage

µl : Micro litre

4-HNE :4-Hydroxynonenal

ADN : acide désoxyribonulique.

ATCC : American Type Culture Collection

C : carbone

CCM : Chromatographie sur couche mince

cm : centimètre

CMB : les concentrations minimales bactériostatique ou Bactéricide

CMI : les concentrations minimales inhibitrices

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

Emb : Embranchement

ERO : les espèces réactives de l'oxygène

F-C : Reactif de folin ciocalteu

FT : flavonoïdes totaux

IC50 : concentration inhibitrice

HE : Huile essentielle

IR : infrarouge

KHz : kilohertz

G : gramme

GPx : glutathion peroxydase

GSH : le glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

Kg : kilogramme

L : Linné

m : mètre

Mg : milligramme

min : minute

ml :Millilitre

MP : menthe poivrée

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

nm : nano mètre

PP : polyphénols

PR : pouvoir réducteur

P-450 : cytochrome P-450

PPT : Polyphenols totaux.

QR: Quercitaine.

R : Rendement

RF : Rapport frontal

S : seconde

SOD : la superxoyde dismutase

TCI : Triple sugar iron.

TPR : Tours par minute

UV : Ultra Violet

XO: xanthine oxydase

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Menthe poivrée

1-1-Le genre mentha 2

1-1-1-Présentation 2

1-2-La menthe poivrée 2

1-2-1-Systématique 3

1-2-2-Historique et origine..... 3

1-2-3- Description botanique de la menthe poivrée..... 3

1-2-4-Propriétés générales 4

1-2-5-Composition 4

1-2-6-Utilisation thérapeutique 5

Chapitre II : Les polyphénols

2-1- Présentation générale sur les polyphénols..... 6

2-2-Classification des polyphénols 6

2-2-1 Polyphénols simples 6

2-2-1-1-Les acides phénoliques..... 6

2-2-1-2- Flavonoïdes 7

2-2-1-3-Alcools phénoliques..... 7

2-2-2-Polyphénols complexes 8

2-2-2-1-les tanins..... 8

2-2-2-2-Lignines 8

2-3- Méthodes Extraction des polyphénols 9

2-4-propriétés des polyphénols..... 9

Chapitre III : Stress oxydatif

3-1- Radical libre 10

3-2-Espèces réactives oxygénées 10

3-3- Stress oxydatif	10
3-3-1- Conséquence du stress oxydatif	10
3-3-1-1- La peroxydation lipidique	11
3-3-1-2- Dommages causés à l'ADN.....	11
3-3-1-3- Dommages causés aux protéines	11
3-4- Antioxydants et systèmes de défense.....	12
3-4-1-Les antioxydants enzymatiques.....	12
3-4-1-1- La superoxyde dismutase (SOD)	12
3-4-1-2-La glutathions peroxydases (GP _X).....	12
3-4-1-3-La catalase	12
3-4-2-Les antioxydants non-enzymatiques.....	13
3-4-2-1-Les vitamines	13
3-4-2-1-1VitamineC	13
3-4-2-1-2- Vitamine E.....	13
3-4-2-1-3-Caroténoïdes.....	13
3-4-2-2-polyphénols	13

Partie Expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1-1-Matériel.....	14
1-1-1-Matériel végétal	14
1-2-Méthodes.....	14
1-2-1-préparation de l'extrait éthanolique.....	14
1-2-2- Tests phytochimiques	15
1-2-2-1-Testes pour les flavonoïdes	15
1-2-2-2-Test pour les tanins	16
1-2-2-3-Test pour les saponines (test de mousse).....	16
1-2-2-4-Test pour les terpenoïdes	16
1-2-2-5-Test pour les glycosides	16
1-2-2-6-Test pour les stéroïdes.....	16
1-2-2-7-Test pour les Cardénolides	17
1-2-2-8-Test pour les Stérols.....	17
1-2-2-9-Test pour les Sucres réducteurs.....	17
1-2-2-10-Test pour les polyphénols	17
1-2-1-11- Test pour les Anthraquinones.....	17

1-2-2-12- Test pour les Anthocyanes.....	.17
1-2-2-13-Test pour les Coumarine17
1-3-Analyses quantitatives17
1-3-1-Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	17
1-3-2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	.18
1-4-Analyses qualitatives19
1-4-1- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)19
1-4-3-Analyse spectroscopique IR.....	.20
1-4-4-Analyse spectroscopique UV-VIS20
1-5-Tests des activités biologiques20
1-5-1-Activité antioxydante20
1-5-1-1-Piégeage du radicale peroxyde d'hydrogène H ₂ O.....	.20
1-5-1-2-Pouvoir réducteur.21
1-5-1-3-DPPH.....	.21
1-5-2- Activité antibactérienne22
1-5-2-1- Microorganismes testés.23
1-5-2-2-Isolement et confirmation des souches bactériennes sensible.....	.23
1-5-2-3-Isolement des souches bactériennes sensibles sur leurs milieux sélectifs.....	.23
1-5-2-4-Examen macroscopique.....	.23
1-5-2-5-Examen microscopique.....	.23
1-5-2-6- Examen complémentaire24
1-5-2-7-Identification des bactéries à Gram négatif.....	.25
1-5-2-8-Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée.....	25
1-5-2-8-1- Préparation des suspensions microbiennes	25
1-5-2-8-2- Ensemencement des boites de pétri.....	25
1-5-2-8-3-Dépôt des disques	26
1-5-2-8-4- Mesure des diamètres des zones d'inhibitions	26
1-5-2-9-Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée.....	26
1-5-2-9-1- Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose	26
1-5-2-9-2-Détermination de la CMB	27

Chapitre 2 : Résultats et discussion

2-1- Extraction des composés phénolique.28
2-2-Testes chimiques d'identification des constituants végétales.28
2-3-Analyse quantitatif29
2-3-1-Dosage des polyphénols et des flavonoïdes29
2-4-Analyse qualitative30
2-4-1-Chromatographie sur couche mince.....	.30
2-4-2-Analyse spectroscopique31
2-4-2-1-Le spectre IR et UV.....	.31
2-5-activité biologique32
2-5-1-activité antioxydante32
2-5-2-Evaluation de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée.....	.33
2-5-2-1-Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de la menthe poivrée33
2-5-2-2-Mesure des diamètres des zones d'inhibition.33
2-5-2-3-Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée.....	.35
2-5-2-3-1-La lecture des CMI35
2-5-2-3-2-La lecture de CMF.....	.36
Conclusion.....	.37

Annexes.

Références bibliographiques.

Résumé.

Remerciement

Avant toute chose, nous remercions le Dieu le tout puissant, pour nous avoir accordées santé, la force, le courage et la patience nécessaire pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au département de chimie, laboratoire de « Chimie Pharmaceutique », sous la direction de Monsieur BENCHOUAK Mounir.

Nous souhaitons remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de notre étude et à la réussite de ce travail.

Tous d'abord, nous tenons à remercier du fond du cœur, notre promoteur Monsieur BENCHOUAK Mounir, professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, et Dr ABDOUN Amar, pharmacien résident en microbiologie à l'hôpital C.H.U de Tizi-Ouzou, en acceptant d'être notre Co-promoteur, pour leurs totale confiance qu'ils nous ont accordé, leurs soutien, leurs précieux conseils, leurs encouragements et leurs disponibilité dans le travail qui ont permis le bon déroulement de ce mémoire.

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury, d'accepter de jury notre travail :

<i>Mme BELMAHDI</i>	<i>Lila</i>
<i>Mr LAYEB</i>	<i>Hatem</i>
<i>Mr RAHAL</i>	<i>Foudil</i>

Nous tenons aussi à remercier tous les enseignants, ingénieurs, techniciens et administrateurs du département Chimie, qui nous ont aidé, guidé et encouragé ; et tous les membres du laboratoire, et nos camarades. Merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble au laboratoire.

Enfin, nous finirons ces remerciements par une citation de Marcel PROUST :

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles son les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. »

Dédicace

C'est avec une grande joie que j'ai débuté ce mémoire, et un léger pincement au cœur que j'ai arrivé aujourd'hui à écrire cette dédicace car elle est la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Je dédie ce travail à ma chère famille

*A mes parents pour leurs amour et leurs encouragement, merci mes parents,
vous êtes les meilleurs j'en suis sure*

*Vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me reconforter et
m'encourager dans les moments de doute... tous les mots ne suffiraient pas...
sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien, votre amour et
pour avoir cru en moi !*

Je dédie ce travail A mes sœurs et mes frères

Nabila, Sabrina, Nacera, Aziz, Saïd,

A ma chère sœur Fadhila et son marie Hamid

A ma chère sœur Fatiha et son marie Hocine

A mes amis chaque avec son nom, en particulier : Lamia, Farida

A l'ensemble des étudiants de ma promotion 2017/2018

«L'art de la réussite consiste à savoir s'entourer des meilleurs»

John F. Kennedy

Nawal



Dédicace

Je dédie ce travail à:

A mes Parents

Pour tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse mener à bien mes études. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de la dignité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi, mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce modeste travail, un réel motif de satisfaction.

A mes chers frères (Belaid et Saïd)

A mes chères sœurs (Dahbia, Kahina, Wahiba et Katia.)

A mes beaux frères (Marzouk, Moukrane et Rachid)

A mes très chère amies Dilia, Nawal

A mes neveux et nièces (Yulian, Anaïs, Yacine, Elena)

A toute ma famille

A tous mes ami(e)s sans exception.

FARIDA



Introduction générale

Depuis des siècles, les algériens ont toujours pratiqués la médication par les plantes, jusqu'à l'apparition de la chimiothérapie par les médicaments élaborés. Les plantes de la famille des labiées sont très répandues en Afrique du nord, la Menthe poivrée et la Menthe pouliot sont des représentant éloquent de cette famille.

La menthe poivrée (*Mentha piprta* L.), une plante médicinale importante appartient à la famille des labiées, c'est un hybride naturel entre la menthe verte (*Mentha spicata* L.) et la menthe aquatique (*Mentha aquatique* L.). Elle est largement cultivée dans les régions tempérées du monde, en particulier en Europe, en Amérique et en Afrique du nord.

La plupart des plantes aromatiques et médicinales contiennent des produits chimiques ayant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, parmi ces composés naturels, les phénols constituent l'un des principaux groupes des plantes agissant en tant que capteurs de radicaux et antioxydants.

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est de quantifier les composés phénoliques de la partie aérienne de la menthe poivrée et d'évaluer *in vitro* leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit comme suite:

La première partie est une étude bibliographique qui comporte trois chapitres dont la présentation de la plante d'étude fait l'objet du premier chapitre. Le deuxième chapitre est consacré aux composés phénoliques. Le troisième chapitre, c'est la présentation des radicaux libres et le stress oxydatif.

La partie expérimentale constitue la deuxième partie du manuscrit composée de deux chapitres. Le premier portera sur le matériel et les techniques utilisés dans cette étude, dont le premier axe concerne l'extraction des composés phénoliques par solvant suivi par la qualification et la quantification des teneurs de ces composés. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés par le pouvoir antioxydant et antibactérien des composés phénoliques de la partie aérienne de la menthe poivrée. Par ailleurs, Le deuxième chapitre est consacré aux résultats et discussion relatifs aux teneurs en composés phénoliques et aux activités antibactérienne et antioxydante de l'extrait. Le manuscrit se termine par une conclusion et des perspectives.

Etude bibliographique

Chapitre 1

Présentation de l'espèce d'étude

La menthe poivrée

**Quant au jardin menthe,*

l'odeur même de celui-ci

recupère et rafraîchit les

*esprits **

1-1-Le genre mentha

1-1-1-Présentation

Les menthes appartiennent au genre *Mentha* de la famille des Labiées ou Labiacées. On en connaît environ 20 espèces, dont les plus répandues sont la menthe aquatique, qui a pour nom scientifique *Mentha aquatica*, la menthe poivrée, *Mentha piperita*, et la menthe verte, *Mentha spicata*, on s'intéresse ici à la menthe poivrée dont les feuilles ont une forte teneur en menthol. Ces différentes espèces sont caractérisées par une tige carrée et des feuilles opposées et dentées, très odoriférantes en raison de l'huile essentielle qu'elles contiennent[1].

La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents, comme elle montre la figure 1, 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].



Figure 1 ■ Aire de répartition de la menthe par le monde (2007)

1-2-La menthe poivrée :

La menthe poivrée (*Mentha piperita L.*), Est une plante médicinale qui a reçu plus d'attention des industries alimentaires et pharmaceutiques en raison de ses avantages pour la santé de la société humaine, c'est une plante aromatique pérenne appartenant à la famille des Lamiacées, genre menthe, et un hybride naturel entre la menthe verte (*Mentha spicata L.*) et la menthe aquatique (*Mentha aquatica L.*) symbolisée en latin par le signe «x». *Mentha piperita* est une plante indigène qui se trouve dans divers pays du monde à la fois cultivée et sauvage, en Europe, en Asie et même en Amérique, et les lieux humides [3].

1-2-1-Systématique : [4]

- ❖ *Embranchement:*
Spermaphytes
- ❖ *Sous Emb:* Angiospermes
- ❖ *Classe :* Dicotylédones
- ❖ *Sous classe:* Gamopétales
- ❖ *Ordre :* Sympetales
- ❖ *Famille :* Labiées
- ❖ *Genre:* Mentha
- ❖ *Espèce :* Mentha x Piperita L

**Figure 2 :** la menthe poivrée [pngree.com]**1-2-2-Historique et origine :**

La menthe poivrée est connue depuis le temps les plus enceins. En effet, l'origine botanique de cette labiée et sa relation avec d'autres espèces du genre Mentha est un problème extrêmement compliqué.

Le nom de la sorte, *piperita*, vient du latin moderne piperitus, qui signifie «poivré», à son odeur fortement poivrée caractéristique [5]. Son nom de "mentha" est lié à la mythologie grecque *Minthe* était une nymphe de la mythologie que *Proserpine*, transforma en fleur à l'odeur poivrée, par jalousie. La plus vieille trace connue de cette espèce de menthe remonte aux XIIIe et XVIIe siècles av. J.-C, en Egypte. Près de Abdel-Quarnah, des archéologues ont trouvé des restes de menthe dans des tombeaux de l'ancienne Egypte, elle était utilisée pour la conservation des momies. Le nom de l'espèce est toujours suivi par le nom abrégé du premier botaniste qui l'a décrite, il s'agit ici de Carl Von Linné, abrégé *L*. En 1753, au début de la nomenclature moderne, Linné reconnaissait *Mentha piperita*, une menthe pourvue d'une forte saveur piquante, comme une espèce à part entière parmi 10 espèces de menthes du genre Mentha [6].

1-2-3- Description botanique de la menthe poivrée

Il s'agit d'une plante vivace à *rhizome* long, rampant, traçant, chevelu. *La tige* est quadrangulaire, dressée, haute de 90^{cm} à 1^m.20, avec une ramification luxuriante, elle se divise en *rameaux* opposés. *Les feuilles* sont simples, opposées, ovales, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, et d'un très beau vert foncé en dessus [7] (Figure3).

Les fleurs, violacées, forment des *épis* très courts, ovoïdes, très serrés, à l'extrémité des rameaux. *Le fruit*, divisé en quatre parties, est entouré d'un *calice* cylindrique, à 5 dents presque égaux [12] (figure 3). *La corolle* est constituée de pétales soudés entre eux qui forment 2 lèvres [8] :

- ❖ La lèvre supérieure est entière ou échancrée.
- ❖ La lèvre inférieure comporte 3 lobes (rarement 5).

Les étamines au nombre de 4 (rarement 2), dont les 2 plus grandes sont soudées à la corolle, possèdent des anthères à 2 loges (rarement 1). *L'ovaire* à 2 carpelles divisés en 2 parties, d'où semble sortir le style. Celui-ci se termine par un stigmate divisé en 2 parties [8].

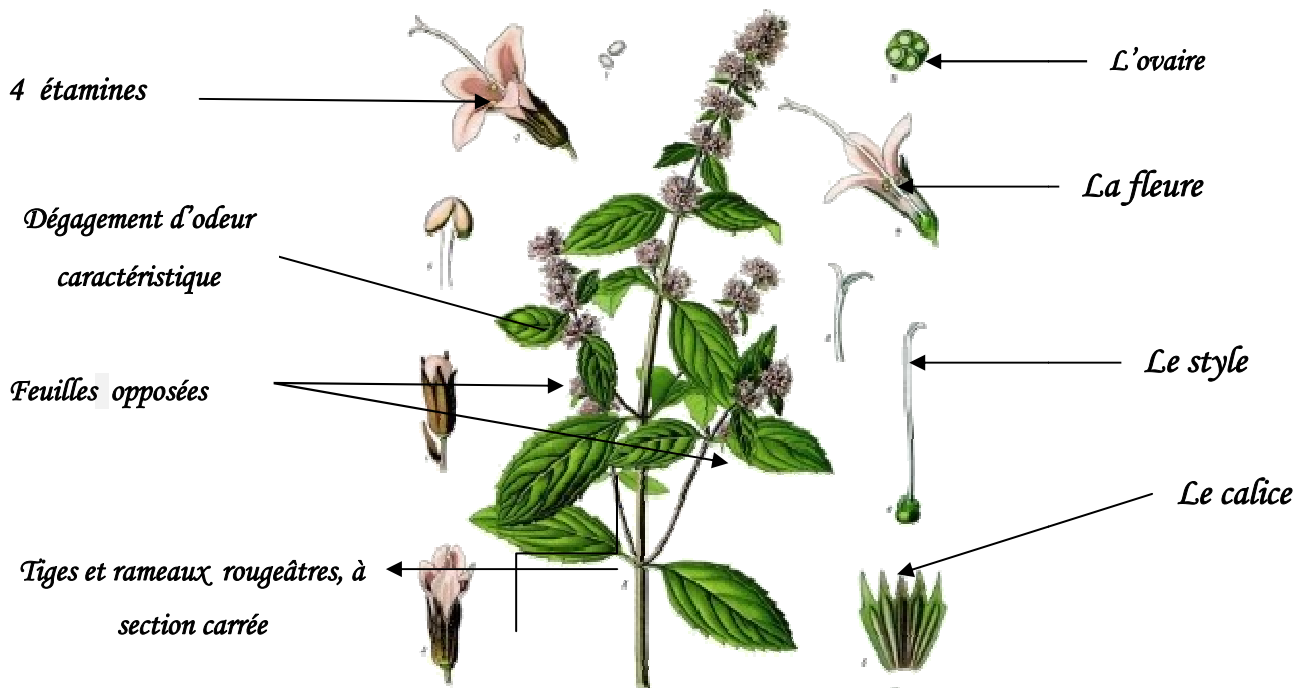


Figure 3 : morphologie de la menthe poivrée

1-2-4-Propriétés générales

La menthe poivrée est amère, stomachique, cordiale et antiacide à un degré plus ou moins grand [9]. Cette espèce très-voisine de la menthe verte, se distingue par son odeur très pénétrante, et surtout par une saveur amère chaude, piquante et aromatique, à peu près comme le poivre, suivie d'une sensation de fraîcheur agréable, quand elle est sèche, elle contient beaucoup d'arome elle est verte [10].

1-2-5-Composition

- ❖ *Acide phénolique* : acide rosmarinique et dérivés de l'acide caféique.
- ❖ Elle contient une très forte proportion de *tanins*.

- ❖ **Flavonoïdes** : ériocitrine, ériodictyol, diosmétine, menthoside (glycosides de la lutéoline, de l'apigénine).
- ❖ **Des monoterpènes et des triterpènes** : le métabolisme des terpènes est fortement influencé par les facteurs environnementaux.
- ❖ **Huile essentielle** : jusqu'à 4% de la matière sèche.

Comme toutes les plantes, *M. piperita* contient de petites quantités de fer et autres minéraux. Sa teneur en fer des feuilles a été rapportée dans la littérature varie considérablement, de 29,2 à 1154 mg / kg [11].

1-2-6-Utilisation thérapeutique

La menthe poivrée est très bénéfique et plante importante. Elle est largement utilisée dans l'alimentation, les cosmétiques et les médicaments :

-Digestive, antispasmodique : La menthe poivrée combat la paresse de l'estomac, les douleurs des intestins, l'aérophagie, les ballonnements, elle augmente la production de bile, soulage les douleurs de foie et des reins.

-Analgésique : elle calme les migraines, les névralgies, les sciaticques en application de l'essence ou de baume spéciale sur les temps ou les parties douloureuses.

-Stimulante : elle active l'appétit.

-Propriétés antibactériennes : des études ont montré une activité antibactérienne de l'extrait de feuilles de menthe poivrée contre les bacilles à Gram négatif et positif.

-Inflammatoires : l'inflammation est considérée comme une réaction de base importante responsable des manifestations de diverses maladies chroniques telles que le cancer, le choc septique, le diabète. Il y a plusieurs rapports que les composés de menthe poivrée ont des rôles cruciaux dans la prévention de l'inflammation et de l'angiogenèse [7].

Chapitre 2

Les polyphénols

2-1- Présentation générale sur les polyphénols

Les polyphénols (PP) qui constituent une famille de molécules organiques, sont largement présents dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence au moins d'un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [12].

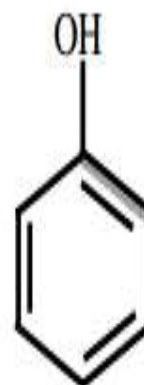


Figure 4 : Structure du noyau phénol [12]

2-2-Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes.

2-2-1 Polyphénols simples

2-2-1-1-Les acides phénoliques

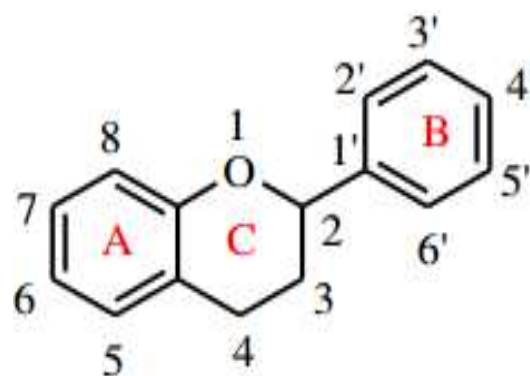
Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques [13].

Tableau 1 : Principales classes des acides phénoliques

<i>Squelette carboné</i>	<i>Classe</i>	<i>Structure de base</i>	<i>Référence</i>
C ₆	Phénols simple		12
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques		14
C ₆ -C ₃	acides hydroxycinnamiques		14

2-2-1-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes *stricto sensu*, pigments végétaux jaune-orangé, leur nom venant du mot latin *flavus* =jaune [23], sont des composés possédant une squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6.



Ce sont les composés les plus abondants par

Figure 5 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes [12]

Tableau 2 : Principale classe des flavonoïdes

Flavonoïdes	Structure de basse	Références
Flavanones		12
Flavonols		12
Chalcones		14
Anthocyanidines		12
Isoflavonoïdes		14

2-2-1-3-Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe [12].

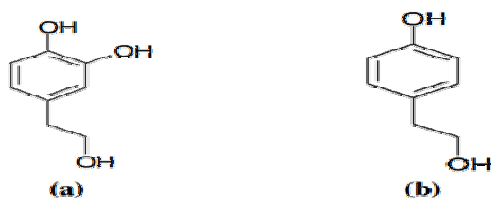


Figure 6 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) [12]

2-2-2-Polyphénols complexes

2-2-2-1-Les tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles, se sont des végétaux de poids moléculaire élevé [15]. Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [12] :

❖ Tanins hydrolysables

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase).

❖ Tannins condensés

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6.

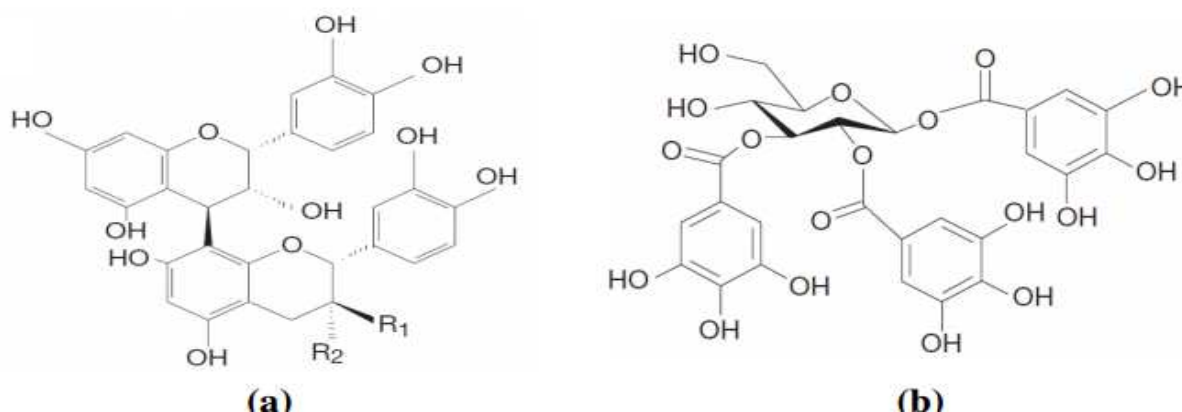


Figure 7 : structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un gallotannin [12]

2-2-2-2-Lignines

La lignine est une macromolécule tridimensionnelle hydrophobe de haut poids moléculaire, faisant partie des polyphénols, et qui est produite par toutes les plantes vasculaires ligneuses et herbacées elle est le troisième polymère naturel le plus abondant. Dans la paroi cellulaire végétale, la lignine remplit les espaces entre la cellulose et les hémicelluloses, et agit comme une résine qui unit l'ensemble de la lignocellulose (biomasse lignocellulosique) [16].

2-3- Méthodes Extraction des polyphénols

Tableau 3 : principales méthodes d'extraction des polyphénols

<i>Macération</i>	<i>L'extraction au Soxhlet</i>	<i>L'extraction assistée par ultrasons</i>
Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse aussi la plus simple. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules PP [14].	Elle consiste à faire passer lentement un solvant à travers une cartouche de papier épais et poreux ou une pochette de papier filtre. Elle présente l'avantage de ne pas utiliser beaucoup de solvants donc peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients [14].	C'est une technique fréquemment utilisée pour l'extraction des composés bioactifs à partir des matières végétales. L'échantillon broyé est mélangé avec le solvant approprié dans un récipient et placé dans un bain à ultrasons, où la température de travail et le temps d'extraction sont réglés. Cette technique utilise des ondes sonores à fréquence supérieure à 20 kHz[14].

2-4-Propriétés des polyphénols

- ✓ Propriétés physique : Les polyphénols sont solides, ils sont solubles dans l'alcool et l'éther.
- ✓ Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement celles du phénol lui-même, elles sont cependant fortement modulées par les substituant typique des noyaux phénoliques, en particulier ceux qui sont capables d'étendre la délocalisation électronique : substituant à effet mésomère donneur d'électrons ou attracteur d'électrons [17].

Chapitre 3

Le stress oxydatif

3-1- Radical libre :

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte [13].

3- 2-Espèces réactives oxygénées :

Le dioxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une faible partie d'O₂ en métabolites potentiellement toxiques: les espèces réactives de l'oxygène (ERO) [12].

Tableau 4 : Les principales espèces réactives de l'oxygène [18].

ERO	Formule chimique
Radical anion superoxyde	O ₂ ⁰⁻
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Trioxygène moléculaire (l'ozone)	O ₃
Oxygène singulet	¹ O ₂
Radical hydroxyle	OH ⁰
Radical hydroperoxyde	HOO ⁰
Radical peroxyde	ROO ⁰
Peroxyde et hydroperoxyde	ROOR' et ROOH
Radical alkoxyde	RO ⁰
Radical oxyde nitrique	⁰ NO
Peroxynitrite	ONOO ⁻
Hypochlorite	CLO ⁻

3-3-Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre espèces oxydantes et antioxydantes in vivo, qui est dû soit à une carence en antioxydants, soit à un excès d'ERO [20]. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments [13].

3-3-1-Conséquence du stress oxydatif :

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéinesetc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus [13].

3-3-1-1-La peroxydation lipidique :

La lipoperoxydation est un terme générique décrivant l'ensemble des réactions entre radicaux libres et les acides gras polyinsaturés. Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présentes dans les membranes cellulaires et subcellulaires, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation [19].

3-3-1-2-Dommages causés à l'ADN :

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène et ceci de plusieurs manières différentes [14].

- ❖ L'oxydation peut toucher directement les bases de l'ADN, et en particulier la guanine. Les multiples attaques possibles (principalement sur les doubles liaisons) peuvent engendrer une dizaine de bases modifiées différentes, qui entraîneront des erreurs de réplication de l'ADN.
- ❖ Le radical hydroxyle peut également viser la liaison entre une base et le ruban de désoxyribose, créant ainsi des sites « abasique ».
- ❖ Le sucre peut être attaqué directement, ce qui provoque des coupures de chaîne « simple brin », ou « double brin » si les deux désoxyriboses sont oxydés au même niveau.
- ❖ Enfin, la modification d'une base par un agent oxydant peut modifier sa réactivité, et provoquer le pontage de protéines sur les nucléotides.

3-3-1-3 : Dommages causés aux protéines :

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation fréquemment influencées par les cations métalliques tels que Cu^{2+} et le Fe^{2+} peuvent être classées en deux catégories [18] :

- ❖ Celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.
- ❖ Celles qui entraînent des modifications des peptidiques par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE(4-Hydroxynonanal).

De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome [21].

3-4-Antioxydants et systèmes de défense

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants. Une stratégie fréquemment retrouvée repose sur la présence de composés antioxydants synthétisés par la cellule contrairement à d'autres apportés par l'alimentation. Donc selon le mode d'action de ces systèmes, on distingue deux classes d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques [14].

3-4-1-Les antioxydants enzymatiques :

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et le glutathion peroxydase (GPx) [19].

3-4-1-1-La superoxyde dismutase (SOD) :

Il existe 3 types différents de SOD, dénommés respectivement SOD1, SOD2 et SOD3. Toutes trois font partie des métalloprotéines où les métaux sont généralement liés à 4 résidus histidine dont le rôle est d'éliminer les O_2^{0-} par une réaction de dismutation qui produit une molécule d'oxygène et une molécule de H_2O_2 à partir de deux O_2^{0-} [18].

Pour leur effet antioxydant, les superoxyde-dismutases sont utilisées en thérapeutique : dans les maladies inflammatoires chroniques, les anions superoxydes relargués par les phagocytes activés stimulent et amplifient la réponse inflammatoire [14].

3-4-1-2-La glutathions peroxydases (GPx) :

La glutathion peroxydase est une enzyme tétramérique permettant également grâce à son co-enzyme le glutathion réduit (GSH) va également pouvoir réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en oxydant le GSH en GSSG. Enfin, GSH permet encore la régénération de certaines molécules anti-radicalaires à partir de leur forme oxydée [23].

Leur rôle principal est d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant, sur les acides gras polyinsaturés en les couplant avec l'oxydation du glutathion.

3-4-1-3-La catalase :

La catalase est une enzyme majoritairement peroxysomale catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La catalase est présente dans un grand nombre de tissus mais elle est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Parmi les enzymes connus c'est un des plus efficaces [24].

3-4-2-Les antioxydants non-enzymatiques :

D'autre mécanisme de lutte contre les radicaux libres entrent également en jeu .Il s'agit de nombreuses molécules exogènes ,notamment apportées par l'alimentation capable d'éliminer ces composés oxydatifs ,ou de stopper les réactions d'oxydations en chaîne ,mais avec une spécificité moindre[23].

3-4-2-1-Les vitamines

Certaines vitamines ont un pouvoir antioxydant et jouent un rôle important dans le maintien de la balance oxydants/antioxydants. C'est notamment le cas des vitamines C et E et des caroténoïdes. Ce sont les trois familles de vitamines les plus actives[18].

3-4-2-1-1- Vitamine C :

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux. Le produit formé est le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines[21].

3-4-2-1-2- Vitamine E

Est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones. Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, β -, γ -, δ - tocophérol, tocotriénols, ...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols)[25] .

3-4-2-1-3- Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène .Il est doué de plusieurs capacités : précurseur de la vitamine A, capte l'oxygène singlet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante[21].

3-4-2-2-Polyphénols : voir chapitre Chapitre 2.

Etude expérimentale

Chapitre 1

Matériel et méthode

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire Chimie pharmaceutique du département de Chimie à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1-1-Matériel

Cette étude est portée sur les composés phénoliques, extraits de la partie aérienne de la menthe poivrée. Pour réaliser cette étude, on a utilisé un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages et des produits chimiques qui sont indiqués en annexe n°1.

1-1-1-Matériel végétal

❖ La récolte

La récolte a été effectuée au début de mois d'avril, début de floraison à la région de Boghni, située à environ 38km au sud-ouest de wilaya de Tizi-Ouzou, l'identification botanique a été faite par Mr MEDDOUR Rachid du département d'Agronomie de l'UMMTO.

❖ Le séchage

Le séchage a une importance majeure pour l'extraction des polyphénols, car les cellules végétales contiennent différents types d'enzymes, susceptibles de provoquer des modifications des composés phénoliques contenus dans le matériel végétal. La partie aérienne de la menthe poivrée a été séchée à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, dans un endroit sec et aéré et cela pendant dix jours, afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique.

❖ Le broyage

Le broyage de la plante permet d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon. Les parties aériennes de la menthe poivrée ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur mécanique (moulin à café) et conservées à sec, et à température ambiante, à l'abri de l'humidité jusqu'à son utilisation.

1-2-Méthodes

1-2-1-Préparation de l'extrait éthanolique

Dans la présente étude, la méthode utilisée est celle de l'extraction par macération, en utilisant un solvant polaire afin d'obtenir des extraits enrichis en molécules d'intérêt (composés phénoliques), nous avons utilisé l'éthanol 96% comme solvant d'extraction.

❖ Mode opératoire

Un poids de 25g de la poudre de la menthe poivrée, est mis en solution dans 100 ml d'éthanol 96% dans un erlenmeyer en verre de 500 ml fermé par un bouchon de caoutchouc recouvert d'un papier d'aluminium. L'aluminium évite à l'éthanol d'entrer en contact avec le caoutchouc, ce qui éviterait les contaminations possibles provenant du caoutchouc. Les erlenmeyers ont aussi été entièrement recouverts de papier d'aluminium pour éviter la

dégradation de molécules photosensibles. Après 24 heures, les mélanges ont été séparés par filtration. Les extraits ont par la suite été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH à une température d'environ 60°C. Cette méthode d'extraction a été réalisée 4 fois afin d'obtenir la quantité suffisante pour les expériences à effectuer. La procédure d'extraction est représentée dans la figure suivante :

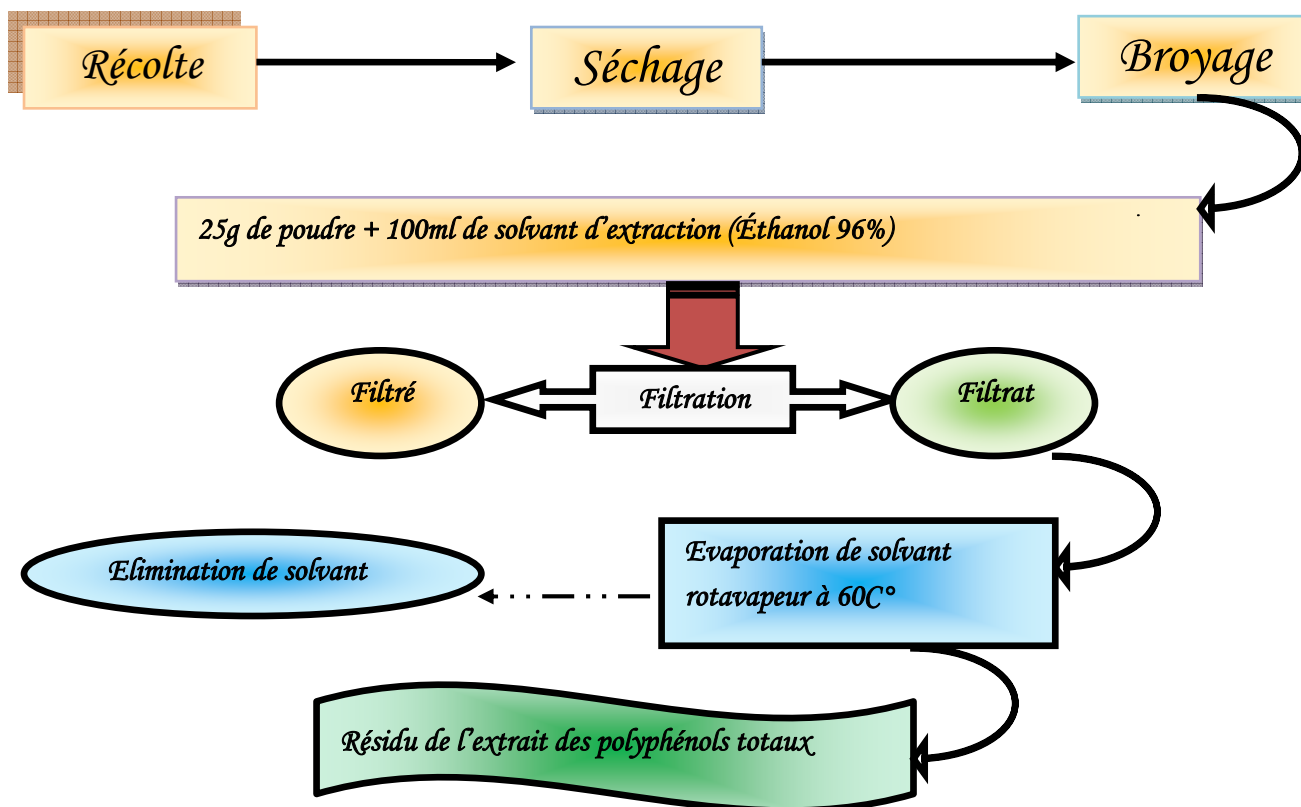


Figure 9 : Protocole d'extraction des phénols totaux de la menthe poivrée.

❖ Détermination de rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

$$R\% = \frac{\text{Masse d'extrait sec}}{\text{Masse de la matière végétale}} * 100$$

1-2-2-Tests phytochimiques

Les réactions de caractérisation qualitative basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ont été effectuées.

1-2-2-1-Testes pour les flavonoïdes

❖ Test 1

5 ml d'une solution d'ammoniaque diluée sont ajoutés à une portion du filtrat d'une solution aqueuse de l'extrait, l'observation de la couleur jaune, et sa disparition après

l'addition de quelques gouttes de l'acide sulfurique concentré, indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [26].

❖ **Test 2**

Quelques gouttes d'une solution chlorure d'aluminium (AlCl_3 à 1%) sont ajoutées à une portion du filtrat aqueux de l'extrait. L'observation de la couleur jaune indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [26].

1-2-2-2-Test pour les tanins

❖ **Test pour les tanins hydrolysables**

0,25g de l'extrait sont ajoutés à 10ml de l'eau distillée dans un tube à essai ; puis porté à l'ébullition puis filtré. Quelques gouttes du chlorure ferreux sont ajoutées au filtrat. L'observation de la couleur bleu-noir indique la présence des tanins galliques [26].

❖ **Test pour les tanins condensés**

Dans un tube à essai, une portion de l'extrait aqueux est ajoutée à l'acide chlorhydrique aqueux (HCl à 1%) et portée au bain-marie à 90°C pendant 15 min. La formation d'une coloration rouge indique la présence de tanins catéchiques [26].

1-2-2-3-Test pour les saponines (test de mousse)

Dans un tube à essai, nous avons introduit quelques milligrammes d'extrait phénolique dans 5 ml d'eau distillée. Puis nous avons bouchés l'ouverture du tube à essai et agités vigoureusement dans le sens de la longueur pendant 15 min. La formation d'une mousse stable de hauteur supérieure à 1 cm, persistant pendant plus de 15 min indique la présence de saponines [14].

1-2-2-4-Test pour les terpenoïdes

À 5 ml d'extrait, 2 ml de chloroforme sont ajoutés et 3 ml d' H_2SO_4 . Le test positif est indiqué par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface [14].

1-2-2-5-Test pour les glycosides

Dans un tube à essai et à 1 ml de solution aqueuse, nous avons ajoutés 1 ml d'acide acétique glacial et 1 ml de H_2SO_4 concentré puis on a rajouté au mélange 2 à 3 gouttes de FeCl_3 2%. L'apparition d'une coloration bleu vert indique un test positif (présence des glycosides) [13].

1-2-2-6-Test pour les stéroïdes

Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait des polyphénols totaux est ajouté à 2 ml de chloroforme. Deux phases ont été observées, l'une marron en haut et l'autre jaune en bas. Après filtration sur papier filtre on obtient une couleur marron violacé qui indique la présence des stéroïdes [14].

1-2-2-7- Test pour Cardénolides

La détection des cardénolides se fait par l'ajout de 2 ml d'acide acétique glacial et une goutte de solution de FeCl_3 à 5 ml de chaque extrait mélangé avec 1 ml de H_2SO_4 concentré. La présence de l'anneau brun sur l'interface indique la présence des cardinilides [14].

1-2-2-8- Test pour les Stérols

A un volume de 5 ml d'extrait, 2 gouttes d'anhydride acétique ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) et 1 goutte d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont ajoutées. La couleur mauve ou violette indique la présence des stérols [14].

1-2-2-9- Test pour les Sucres réducteurs

On ajoute 1 ml de liqueur Fehling à 5 ml d'extrait, puis on chauffe les tubes contenant les mélanges au bain marie à 40°C . L'apparition d'une couleur rouge brique indique la présence des sucres réducteurs [14].

1-2-2-10- Test pour les polyphénols

Dans un tube à essai, à 1ml de solution éthanolique ajoutez quelques gouttes de FeCl_3 2%. L'apparition d'une coloration noirâtre indique la présence des polyphénols [13].

1-2-2-11- Test pour les Anthraquinones

Un volume de 5 ml de NH_4OH à 10% est mélangé avec 10 ml d'extrait, en maintenant l'agitation. La coloration violette indique la présence des anthraquinones [14].

1-2-2-12- Test pour les Anthocyanes

Ce test repose sur le changement de la couleur du filtrat. On ajoute au filtrat quelques gouttes de HCl pur. On a changement de la couleur. On ajoute quelques gouttes de NH_4OH , le changement de la couleur une deuxième fois indique la présence des anthocynes [13].

1-2-2-13-Test pour les Coumarines

5 ml d'extrait placé dans un tube à essai porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est ajouté à 1ml d'eau chaude. Après agitation. Le volume total est divisé en deux volumes, l'un sert de témoin et l'autre est ajouté à 0.5 ml de NH_4OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines [18].

1-3-Analyses quantitatives**1-3-1-Dosage des polyphénols totaux (PPT)**❖ **Principe**

Le dosage des PPT solubles est effectué par la méthode au Folin-Ciocalteu décrite par McDonald et al., 2001 [27]. Le réactif de F-C est un acide de couleur jaune constitué

d'un mélange de deux acides: acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g extrait).



Figure 10 : Principe de la réduction du réactif de Folin-Cioecalteu

Mode opératoire

Un volume de 0.125 ml d'une solution méthanolique de l'extrait (0.1mg/ml) est ajouté à 1.250 ml du réactif de Folin- Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée (1/10), après 10 min d'agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 5 min à 22 C° , un volume de 1 ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 aqueux à 1M est ajouté. Le mélange obtenu est agité puis chauffé à 45 C° pendant 15 minutes dans un bain Marie. L'absorbance du mélange réactionnel est mesuré à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETRE, UV-4211/SO) contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, on remplaçant le volume de l'extrait par le même volume de l'eau distillé.

1-3-2- Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé a été déterminé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) de **chang et al., 2002** [28].

❖ Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols.

❖ Mode opératoire

0.250 ml de la solution méthanolique (0.1mg/ml) de l'extrait est séparément mixé avec 0.75 ml du méthanol, 50 μ l de $AlCl_3$ aqueux à 10 %, 50 μ l d'acétate de sodium ($C_2H_3Na_2O_2$) aqueux (1M) et 1.4 ml d'eau distillée. Après incubation à température ambiante pendant 30

minutes, les absorbances du mélange réactionnel sont mesurées à 415 nm avec le spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETRE, UV-4211/SO). Le volume du chlorure d'aluminium aqueux à 10 % est substitué par le même volume d'eau distillée dans l'échantillon blanc. Une courbe de calibration est préparée de la même manière à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes solutions méthanolique de la quercetine allant de la concentration de 25 à 100 µg/ml.

1-4-Analyses qualitatives

1-4-1- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

➤ Principe de la méthode

Afin d'avoir une idée sur la composition chimique de notre extrait, nous avons effectués un criblage pythochimique par CCM. C'est une technique analytique utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption et s'applique aux molécules pures, aux extraits et aux échantillons biologiques.

La séparation s'effectue par migration des molécules à travers la phase stationnaire dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile) [14].

➤ Le choix de la phase mobile

Plusieurs systèmes de solvants sont exploités durant cette manipulation, le choix de système est basé sur ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

Pour avoir les empreintes flavoniques d'extrait et avoir une idée sur les bons systèmes de séparation et isolement, on a essayé plusieurs systèmes solvants et on a gardé celui qui donne autant de taches.

L'extrait phénolique dont le système choisis (phase mobile) est un mélange Chloroforme, Ethanol, Acide acétique et d'eau (40V : 6V : 0,1V :0,2V).

➤ **Echantillon** : L'extrait phénolique de la partie aérienne de la menthe poivrée, dilué dans l'acétate d'éthyle et butanol.

➤ Révélation

La révélation est faite sous une lampe à UV (ultra violet) qui met en évidence la présence des flavonoïdes. La confirmation de la présence des flavonoïdes à été réalisée par l'ajout de l'iode qui provoque le changement de la couleur des taches obtenues.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal R_f , calculé par la formule suivante :

$$R_f = d/D$$

- ✓ *d* : Distance parcourue par le constituant.
- ✓ *D*: Distance parcourue par la phase mobile (front du solvant).

1-4-3- Spectroscopie infrarouge IR

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs des PP testés, on a eu recours à la spectrophotométrie à infrarouge qui est une méthode d'analyse rapide, simple et précise. Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie, faculté pharmacie de Tizi-Ouzou.

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour identifier groupes fonctionnels caractéristiques de l'extrait. Une petite quantité (5mg) de l'extrait a été dispersée dans du bromure de potassium sec (KBr). Le mélange a été soigneusement mélangé dans un mortier, puis le disque a été placé dans une coupelle d'échantillon d'un accessoire de réflectance diffuse. Le spectre IR a été obtenu en utilisant Perkin Elmer 2000 infrarouge spectromètre.

1-4-4-Spectroscopie UV-Vis

Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire Physicochimie des matériaux LPCM UMMTO.

Dans une cuve en Quartz de 1 cm de largeur, on introduit l'extrait brute méthanolique à analyser, environ 2 ml, avant cette procédure on étalonne d'abord l'appareil par le témoin, qui est dans notre cas le méthanol pure.

1-5-Tests des activités biologiques

1-5-1-Activité antioxydante

1-5-1-1-piégeage de H₂O₂

Le piégeage du radical peroxyde d'hydrogène a été déterminé par la méthode de **Ruch et al., 1989**.

Quatre solutions de l'extrait à différentes concentrations ont été préparées selon le tableau suivant

Tableau 5 : solution à différentes concentration préparées de l'extrait éthanolique.

Solution	1	2	3	4
Concentration (mg/ml)	50	100	150	200

Une solution de H₂O₂ à une concentration de 2mmol/L à été préparée dans le tampon phosphate (pH=7.4). Un volume de 0.6ml de chaque solution d'extrait a été mélangé avec 10ml de la solution de H₂O₂.

D'une part on prépare un blanc dans la même condition sans la présence de l'extrait.

Après 10min, l'absorbance de peroxyde d'hydrogène a été mesurée à 230nm [29].

$$\% \text{ de piégeage } \text{H}_2\text{O}_2 = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100$$

Tel que :

✚ A_0 : représente l'absorbance sans l'antioxydant.

✚ A_1 : représente l'absorbance en présence d'antioxydant.

1-5-1-2-Pouvoir réducteur

❖ Principe

Les substances ayant un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700 nm [19].

❖ Mode opératoire

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986) [30]. Les différentes concentrations d'extrait dans le méthanol (2-10mg/ml) (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné pour stopper la réaction. Le tout est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5ml de l'eau distillée et 0.5 ml d'une solution de chlorure ferrique FeCl_3 fraîchement préparée à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de le méthanol qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de extrait testé.

1-5-1-3-Test de piégeage du radical DPPH°

❖ Principe

La molécule de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'atome d'hydrogène(antioxydante), il y'aura formation de la forme réduite (Figure 11). Ceci provoque la perte de la coloration violette du DPPH° (forme radicalaire) en coloration jaune (forme réduite) caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm [19]. Utilisé en tant que réactif, le test au DPPH (2,2-diphényl-1-pycril-hydrazylhydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour révéler les propriétés antioxydantes des différentes espèces.

❖ Mode opératoire

1 ml de 0,006% solution de DPPH dans l'éthanol est mélangé avec un volume égal de notre extrait préparé à différentes concentrations (0,04 à 0,2 mg/ml) et maintenu dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/V Spectrophotomètre).

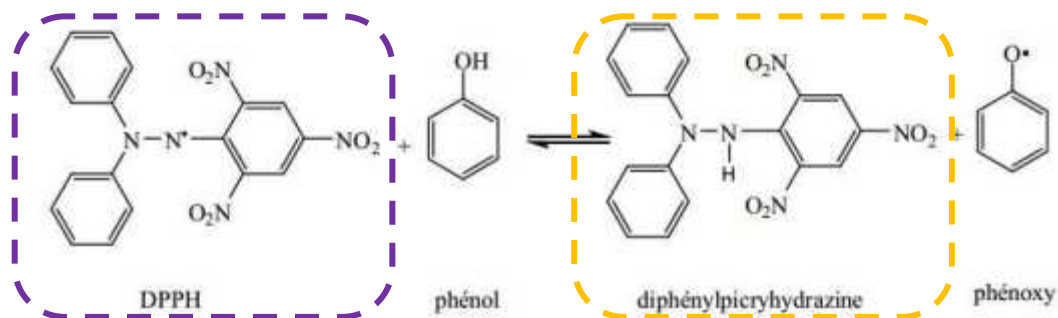


Figure 11: Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite

L'essai à blanc est composé de 1ml de la solution éthanolique au DDPH et de 1 ml d'éthanol. La substance de référence est représentée par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé [31].

❖ Expression des résultats :

❖ **Calcul des pourcentages d'inhibition :** On calcule ainsi le pourcentage d'inhibition par la formule suivante :

$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$ Avec : *AC*: Absorbance du blanc ; *AT*: Absorbance du test effectué.

❖ **Calcul des IC50 :** IC50 ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC50 pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH[•]. La IC50 est calculée graphiquement par la régression linéaire de graphe tracé ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de la fraction testée.

❖ **Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity):** L'activité antiradicalaire est déterminée en calculant l'inverse de la valeur de IC50 : $AAR = 1 / IC50$.

1-5-2- Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des PP de la menthe poivrée a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté Pharmacie de Tizi-Ouzou, sous la responsabilité du Dr A.ABDOUN.

Le test d'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de la partie aérienne de la menthe poivrée a été réalisé par deux méthodes:

- ❖ Par la méthode de diffusion sur milieu solide, dans une première étape qui permet de prévoir l'efficacité in vitro des polyphénols de la menthe poivrée, et la présélection des souches sensibles à son pouvoir antimicrobien.
- ❖ Dans la deuxième étape, par la méthode de dilution en milieu solide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

1-5-2-1- Microorganismes testés

Les microorganismes testés proviennent des laboratoires de Microbiologie et de Parasitologie de l'hôpital Nadir Mohamed de Tizi-Ouzou. Ils correspondent aux espèces suivantes: (voir annexe5).

❖ Les espèces bactériennes utilisées

- Escherichia coli
- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylococcus aureus.

L'espèce fongique utilisée :

- Candida Sp.

1-5-2-2- Isolement et confirmation des souches bactériennes et fongiques sensibles

Les espèces que nous avons utilisé ont été déjà au préalable confirmés par le service microbiologie de CHU de Tizi-Ouzou. Nous avons tenu à vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires, par quelques tests biochimiques et culturaux.

1-5-2-3-Isolement des souches fongiques bactériennes sensibles sur leurs milieux sélectifs

E. coli et P. aeruginase sont ensemencées sur le milieu Hektoen, S. aureus est ensemencée sur le milieu Chapman, candida Sp est ensemencée sur un milieu sabouraud [40]. Les souches sont incubées pendant 24h à 37°C.

1-5-2-4-Examen macroscopique

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur les milieux solides (taille, pigmentation, contour, aspect, couleur).

1-5-2-5-Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement (G×100) permet de classer les bactéries selon leurs Gram, leurs morphologie cellulaire, leurs mode d'association [32].

❖ Examen à l'état frais

Sans avoir subi de coloration particulière : une préparation est obtenue avec le dépôt d'une goutte de la suspension bactérienne entre lame et lamelle, puis on observe au microscope (G×40) la présence éventuelle de bactéries ou de levures, les renseignements obtenus par cette observation concernant principalement la mobilité des bactéries [33].

❖ Examen après coloration de GRAM

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. Elle a été effectuée selon la méthode décrite par DENIS F et al [34], la technique est indiquée en annexe n°7.

1-5-2-6-Examen complémentaire

Tableau 6 : Examens complémentaires.

<u>Test</u>	<u>Principe</u>	<u>Technique</u>	<u>Lecteur</u>
Catalase [35]	<p>La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :</p> $2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$	Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes).	<p>Catalase+ : effervescence.</p> <p>Catalase - : pas d'effervescence.</p>
Coagulase [33]	Ce test, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma, est le principal test caractérisant <i>S. aureus</i> . Il permet donc de différencier le Staphylocoque doré des Staphylocoques- coagulase négative.	<p>Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma oxalaté + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon cœur cervelle de la souche à étudier.</p> <p>Placer le mélange à 37°C. Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.</p>	<p>Coagulase + : Coagulation du plasma.</p> <p>Coagulase - : Pas de coagulation du plasma.</p>
Oxydase [33]	La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylènediamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylènediamine.	Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque.	Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet.

1-5-2-7-Identification des bactéries à Gram négatif

❖ *Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron)*

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C. La fermentation des sucres se traduit par le virage de la couleur de milieu au jaune, le dégagement de gaz se traduit par la formation des bulles de gaz dans la masse du culot, alors que la production d'H₂S se traduit par le noircissement du milieu [36].

❖ *Test de Simmons*

L'ensemencement est réalisé dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C. L'utilisation de citrate se traduit par la libération des ions OH⁻, qui alcalinisent le milieu en se traduit par la couleur bleue après le virage du vert de bromothymol [37].

❖ *Caractères biochimiques*

➤ La galerie Api 20 E

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données, le principe et le mode opératoire sont indiqués en annexe n° 8.

1-5-2-8-Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée (aromatogramme)

➤ **Extrait phénolique des parties aériennes de la menthe poivrée**

Les solutions d'extrait sont préparées dans le DMSO et le méthanol. Les dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations du 1, 1/2, 1/4 et 1/8 à partir de la solution mère.

1-5-2-8-1- Préparation des suspensions microbiennes

Pour cela, à l'aide d'une pipette pasteur flambée, on racle 2 à 3 colonies bien isolées que l'on décharge dans un volume d'environ 5ml d'eau physiologique stérile de façon à obtenir une suspension d'une opacité approximativement de 0.5MC Farland [38].

1-5-2-8-2- Ensemencement des boîtes de pétri

On imbibe un écouvillon stérile de la suspension bactérienne ou fongique puis on l'essor en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée M-H sèche de haut en bas, en stries serrées, puis on refait la même opération deux fois en tournant la boîte d'un angle de 60°, après chaque application, de sorte à avoir une culture homogène en nappe [39].

1-5-2-8-3-Dépôt des disques :

Les disques utilisés sont des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètre, sont déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur le milieu gélosé ensemencé préalablement avec les suspensions microbiennes, les disques doivent être espacés d'au moins 24mm centre à centre [40].

Pour chaque boîte de pétri on dépose 3 disques :

- ✓ Un disque qu'on imprègne de 10 µl d'extrait méthanolique (S1) prélevé à l'aide d'une micropipette.
- ✓ Un disque de témoin négatif qu'on imprègne de méthanol.
- ✓ Des disques d'antibiotique utilisés comme témoins positifs (T+).

Les mêmes opérations sont réalisées pour l'extrait de DMSO (S2) sauf dans ce cas le disque de témoin négative est imprégné de DMSO.

1-5-2-8-4- Mesure des diamètres des zones d'inhibitions

À l'aide d'un pied à coulisse, on mesure les diamètres des zones d'inhibitions de la prolifération bactérienne autour des disques imprégnés d'extrait méthanolique et du DMSO pour toutes les souches testées et le résultat sera exprimé en mm. Pour cette technique (aromatogramme), la sensibilité du germe testé pour 10 µl d'extrait peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu en se référant au tableau suivant :

Tableau 7 : Corrélation entre sensibilité du germe et taille du halo d'inhibition

<i>Taille du halo d'inhibition</i>	<i>Conclusion</i>
Diamètre Inférieur ou égal à 8 mm	La sensibilité du germe est nulle
Diamètre compris entre 8 et 14 mm	La sensibilité du germe est limitée
Diamètre compris entre 14 et 20 mm	La sensibilité du germe moyenne
Diamètre supérieur ou égale à 20 mm	Le germe est très sensible

1-5-2-9-Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée**1-5-2-9-1- Détermination de la CMI par la méthode de dilutions en milieu solide**

La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée correspond à la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe à l'œil nu [40]. Les germes ayant montré une activité antibactérienne positive, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de dilution en milieu solide.

-NB : un schéma montrant la méthode en détail est représenté en annexe n° 9.

Tableau 8 : Préparation des différentes dilutions de l'extrait (méthanolique/eau et DMSO)

Extrait (ml)	1	0.5	0.25	0.125
Gélose M-H (ml)	19	19.5	19.75	19.875

On transvase chaque dilution dans une boîte de pétri et on agite afin d'homogénéiser le mélange, puis on imprègne 2 μ L des 04 souches sur chaque boîte.

1-5-2-9-2-Détermination de la CMB/CMF

CMB correspondent à la plus faible concentration tuant 99,9% des micro-organismes en culture sur ce milieu [41].

Afin d'apprécier la nature de l'activité antimicrobienne d'extrait phénolique de la menthe poivrée (fongistatique ou fongicide), pour candida Sp, on transfère le disque de la dilution, qui n'a pas montré de croissance visible (c'est à dire celles qui sont supérieures ou égale à la CMI), sur des boîtes contenant 20 ml de M-H. Les boîtes sont incubées 24h à 37°C.

En effet, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est inférieur ou égale à 4, l'extrait phénolique est bactéricide et /ou fongique. Quand ce rapport est supérieur à 4, l'extrait phénolique est dit bactériostatique et/ou fongistatique.

Chapitre 2

Résultats et discussions

2-1- Extraction des composés phénoliques

La matière végétale, qui est un mélange hétérogène, est soumise au contact avec un solvant. L'extraction a été faite dans un solvant, accessible et universel : l'éthanol. Bien qu'étant un solvant organique, il possède une grande polarité qui lui permet d'extraire autant de molécules polaires, comme les polyphénols. L'extrait éthanolique récupéré après évaporation a été pesé pour déterminer le poids sec résultant.

➤ Le rendement d'extraction

Le rendement R en polyphénol a été déterminé par rapport à 50g de poudre de la menthe poivrée.

Tableau 9 : Rendement d'extraction de la partie arienne de la menthe poivrée

<i>Quantité de la plante (g)</i>	50g
<i>Volume d'éthanol</i>	200ml
<i>Durée d'extraction</i>	24h
<i>Rendement(%)</i>	4.46%
<i>Aspect</i>	Visqueux
<i>Couleur</i>	Vert foncé

2-2-Testes chimiques d'identification des constituants végétales

Les résultats des tests chimiques d'identification des constituants de l'extrait donnent le tableau suivant :

Tableau 10 : résultats des tests chimiques d'identification des constituants de l'extrait

<i>Tests</i>		<i>Résultats</i>
<i>Flavonoïdes</i>	<i>Test 1</i>	+
	<i>Test 2</i>	+
<i>Tanins hydrolysables</i>		+
<i>Tanins condensés</i>		-
<i>Saponines</i>		-
<i>Terpenoïdes</i>		-
<i>Glycosides</i>		-
<i>Stéroïdes</i>		+
<i>Cardénolides</i>		+
<i>Stérols</i>		-
<i>Sucres réducteurs</i>		+
<i>Polyphénols</i>		+
<i>Anthraquinone</i>		-
<i>Anthocyane</i>		+
<i>Coumarine</i>		-

(+) : Présence du constituant dans l'extrait.

(-) : Absence du constituant dans l'extrait.

2-3-Analyse quantitative

2-3-1-Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait préparé, réalisés par les méthodes spectrométriques de McDonald et al., 2001 et Chang et al., 2002 ont donnés les résultats suivants :

➤ Pour les PP

L'équation de la courbe de calibration préparée par l'acide gallique est :

$$y = 0.0051x - 0.0335, r^2 = 0.9974 \implies C_{ppt} = (y + 0.0335)/0.0051 \text{ (mg/ml)}$$

y= l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

x= la concentration de la solution de l'acide gallique (mg/l) dans le méthanol-eau (50 ; 50, v/v).

C_{ppt} = La concentration de la solution recherchée des polyphénols totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (AGE) en (mg/l).

➤ **Pour les Flavonoïdes**

L'équation de la courbe d calibration préparée par la quercetine est :

$$y = 0.006x + 0.025, r^2 = 0.9517 \implies C_{ft} = (y - 0.025)/0.06 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

y = l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

x= la concentration de la solution méthanolique de la quercetine ($\mu\text{g/ml}$).

C_{ft} = la concentration de la solution recherchée des flavonoïdes totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (QR) en ($\mu\text{g/ml}$).

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-Visible de l'extrait de la partie aérienne de la menthe poivrée étudié sont consignés dans le tableau 11. Dans cette composition, nous constatons que cet extrait est quantitativement riche en composés phénoliques.

Tableau 11: composition de l'extrait de la partie aérienne de la menthe poivrée en composés phénoliques

<i>Solution méthanolique de l'extrait 0.1mg/ml</i>			
<i>Taux des polyphénols totaux (mg AGE/g extrait)</i>		<i>Taux des flavonoïdes totaux (mg QR/g extrait)</i>	
<i>Essai 1</i>	610.78	<i>Essai 1</i>	8.16
<i>Essai 2</i>	728.43	<i>Essai 2</i>	6.66
<i>Essai 3</i>	497.06	<i>Essai 3</i>	10.16
C_{ppt}	612.09	C_{ft}	8.33

mg AGE/g : milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de l'extrait.

mg QR/g : milligramme d'équivalents de la quercetine par gramme de l'extrait.

Ces résultats nous indiquent que l'extrait phénolique des parties aériennes de la menthe poivrée est majoritairement constitué de polyphénols totaux et sa composition en flavonoïdes est relativement faible. Les flavonoïdes sont considérés comme une sous classe des composés phénoliques, il est par conséquent logique que la teneur en PPT de l'extrait soit directement reliée à la teneur en flavonoïdes.

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par plusieurs auteurs sur la composition phénolique de la menthe poivrée. Generali Mekini I et al., 2014[42]; Nihal M et al., 2013[43], ont rapporté que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait phénolique de notre plante.

Notre étude a été réalisée sur une plante de 3 ans et la récolte a été effectuée au début de la floraison ; peu de données bibliographiques concernant la teneur en composés phénoliques de la plante choisie par les méthodes de dosage et le solvant utilisés, les études de Fialová S et al., 2015 sur la variation des composés phénoliques de la menthe poivrée au cours d'une période de quatre ans[44] et la variabilité des métabolites secondaires de la menthe poivrée pendant le développement de l'inflorescence[45], ont montrées une forte teneur en composés phénoliques et faible en flavonoïdes pour une plante de 3 ans, et la meilleure période de récolte a été déterminée comme étant le début de la floraison. D'autres études précédentes rapportent que les plantes ayant des rendements élevés en extrait contiennent une forte teneur en composés phénoliques [46].

2-4-Analyse qualitative

2-4-1-Chromatographie sur couche mince

Les résultats obtenus par la CCM sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 12 : Rapport frontaux et couleur des taches avant et après révélation par I₂

<i>Extrait</i>	<i>Acétate d'éthyle</i>				<i>Butanol</i>
	Tache1	Tache2	Tache3	Tache4	
<i>Taches</i>	Tache1	Tache2	Tache3	Tache4	Tache5
<i>Couleur avant l'ajout d'I₂</i>	Jaune	Jaune	Jaune	verte	Verte
<i>Couleur après l'ajout I₂</i>	Marron	Marron	Jaune	Verte	Jaune
<i>RF</i>	0.23	0.43	0.6	0.86	0.86

La séparation par CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanol obtenu a montré la présence de (04) taches ayant des rapports frontaux différents 0.23, 0.43, 0.6, 0.86, et que l'extrait butanolique a décelé une seule tache avec un rapport frontale de 0.86 (voir annexe

n°4). Cette analyse a permis de mettre en évidence des taches (spots) colorées surtout en jaune et vert. Ces colorations confirment la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes.

La confirmation est faite par l'ajout de l'iode. Ce dernier provoque en présence des flavonoïdes un changement de couleur des taches vers le jaune, jaune vert ou ocre.

2-4-2-Analyse spectroscopique

2-4-2-1-Les spectres IR et UV

Les spectrophotomètres IR et UV-V peuvent être l'outil les plus puissants pour identifier les types de liaisons chimiques (groupes fonctionnels) présentes dans l'extrait. Le spectre IR a été utilisé pour identifier le groupe fonctionnel des composants actifs sur la base de la valeur de la région du rayonnement infrarouge. Les résultats des études spectroscopiques ont révélé la présence de divers constituants chimiques dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la menthe poivrée avec différentes valeurs de pics correspondent à :

Tableau 13 : Les différentes valeurs de pics du spectre IR.

La longueur d'onde (Cm ⁻¹)	Le groupement correspondant
3432.01	OH (présence de composé phénolique)
2927.99	OH et CH
1634.78	C=O (typique des flavonoïdes)
1446.1	COOH et CH ₂
1384.11	OH phénolique
1267.8 et 1114.83	Ester et Alcool secondaire
1056.18	C-H (caractéristique pour le noyau aromatique)
1044	Cétone

Le spectre UV-Vis à des bandes d'absorption de 200.61 à 290.20 cm⁻¹, caractéristiques des flavonoïdes et leurs dérivés. Les spectres des flavonoïdes sont typiquement constitués de deux maxima d'absorption dans les gammes et 300-350 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), 230-290 nm ($n \rightarrow \pi^*$). La spectroscopie UV-Vis et IR s'avère être des méthodes véridiques et sensibles pour détection de la composition biomoléculaire. Les spectres IR et UV-Vis indiqués en annexe n°2 de l'extrait phénolique ont confirmés la présence de phénols et flavonoïdes, par conséquent, il peut être utilisé comme antioxydant d'origine naturelle dans divers médicaments et formulations pharmaceutiques contre les traitements de différentes maladies liées au stress oxydatif.

2-5-Activité biologique

2-5-1-Activité antioxydante

L'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits, dans ce travail, nous avons utilisé trois méthodes pour évaluer l'activité antioxydante in vitro de la plante étudiée à savoir : DPPH, PR, H₂O₂. Ces tests ont été choisis parmi les tests les plus cités dans la littérature

➤ Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Tableau 14 : Résultat de l'activité anti radicalaire de l'extrait vis-à-vis de H₂O₂.

[C](mg/ml)	Blanc	50	100	150	200
A	0.970	0.748	0.669	0.406	0.168
% H ₂ O ₂	0	22.86	31.03	58.14	82.68

D'après les résultats obtenus et qui sont exprimé sous forme de graphe indiqué en annexe n°3, on remarque que l'absorbance de peroxyde d'hydrogène diminue avec l'augmentation de la concentration des solutions en extrait de la menthe poivrée.

➤ Test de DPPH et PR

Le **tableau 15** : l'évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce étudié.

DPPH		Solution éthanolique (mg/ml)					150
		0.04	0.075	0.06	0.08	0.2	
% de réduction du DPPH•	Extrait	19.09	40.78	52.64	79.48	87.94	0.075
	A.asc	39.40	51.03	68.57	97.84	98.36	13.33
PR		Solution éthanolique (mg/ml)					
		Blanc	2	4	6	8	
Absorbance		0.049	0.464	0.87	1.07	1.16	1.16

Comme la concentration en composés phénoliques augmente, leur activité antioxydante augmente. Il ressort de ces résultats que le pouvoir oxydant est très significativement dépendant de la concentration. La majorité des travaux publiés portant sur la plante choisie pour cette étude se limitent à l'évaluation de la capacité antioxydante des huiles essentielles. Très peu de travaux sur l'activité antioxydante des extraits non volatils ont été rapportés dans la littérature. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par Nidhal M et al., 2013 [43], qui ont signalé que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de la menthe poivrée augmente avec l'augmentation de la concentration.

La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans la partie aérienne de menthe poivrée peut expliquer leur forte activité antioxydante. Cette activité est directement liée à la

structure phénolique qui confère à la molécule la capacité de générer des radicaux libres stabilisés par résonance. Les composés phénoliques peuvent transférer un hydrogène du noyau phénol à un radical de haute énergie, Cette capacité antioxydante (capture des espèces réactives de l'oxygène) est encore accrue pour les composés phénoliques possédant deux groupes hydroxyles en ortho [47]. Ceci montre également la capacité de notre extrait à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes, ce qui indique qu'il peut être un agent thérapeutique utile pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux ce qui peut être aussi bénéfique dans la conservation des produits alimentaire, des formulations médicamenteuses et des produits cosmétiques.

2-5-2-Evaluation de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée

2-5-2-1-Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de la menthe poivrée

➤ Confirmation des souches bactériennes sensibles

Le tableau suivant regroupe les résultats des différents tests de confirmation des souches bactériennes sensibles utilisées.

Tableau 16: Caractère des souches bactériennes sensibles étudiées

<i>Test</i>	<i>Bactéries</i>			
	E. Coli ATTC	S.aureus ATTC	P. Aeruginosa	Candida
<i>Aspect macroscopique</i>	Colonies rondes, saumons lisses.	Colonie entourées d'une auréole jaune	Colonies verte et fine	Colonies blanchâtre
<i>Coloration de GRAM</i>	-Coccobacilles -Gram-	- Cocci par en amas - Gram+	- Bacilles fins - Gram-	NR
<i>Etat frais</i>	Mobile	Immobile	Très mobile	Immobile
<i>Catalase</i>	+	+	+	NR
<i>Oxydase</i>	-	-	+	NR
<i>Coagulase</i>	NR	+	NR	NR
<i>Fermentation des sucres TSI</i>	Glucose(+) Saccharose(+) Lactose(+)	NR	Glucose(-) Saccharose(-) Lactose(-)	NR
<i>Citrate de Simmons</i>	-	NR	+/-	NR

NR= non recherché

+ : test positif

- : test négatif

2-5-2-2- Mesure des diamètres des zones d'inhibition

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique de la MP a été réalisée par la technique de diffusion en utilisant le milieu gélosé solide (M-H). L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de zone d'inhibition produite autour des disques après 24h d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe.

Les résultats de l'aromatogramme sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Activité antibactérienne des deux extraits sur le milieu M-H

<i>Souche microbienne</i>	<i>Diamètre des zones d'inhibition obtenue pour S1</i>	<i>Diamètre des zones d'inhibition obtenue pour S2</i>	<i>Taille du halo d'inhibition</i>	<i>Conclusion</i>
<i>E. coli</i>	-	9mm	[8mm-14mm]	la sensibilité du germe est limitée
<i>S.aureus</i>	9mm	12 mm	[8mm-14mm]	la sensibilité du germe est limitée
<i>P. aeruginosa</i>	-	9mm	[8mm-14mm]	la sensibilité du germe est limitée
<i>Candida</i>	-	8mm	Inf ou égale a 8mm	la sensibilité du germe est nulle

- : pas d'inhibition.

S1 : représente la solution préparée à partir de 51.2 mg d'extrait dans le solvant méthanol.

S2 : représente la solution préparée à partir de 200 mg d'extrait dans 1 ml de DMSO.

L'analyse qualitative de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque révèle des diamètres de zones d'inhibition des différentes souches à différentes concentrations de l'extrait variant entre 0mm (pas d'inhibition) et 12mm.

Il est remarquable que la concentration 52.1mg/ml montre l'effet d'inhibition le plus faible par rapport à 200mg/ml. Le témoin DMSO n'a exercé aucune activité inhibitrice, les colonies se développent normalement en sa présence, donc c'est un bon diluant pour l'extrait.

L'extrait phénolique s'est révélé actif envers toutes les souches bactériennes et fongiques testées mais avec des degrés différents. Le tableau N°17 montre que la solution préparée à partir de DMSO a une faible activité vis-à-vis des souches *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *Candida Sp*, alors que la solution préparée à partir de méthanol présente un seul diamètre de la zone d'inhibition pour le *S. aureus* à 9mm.

Ceci nous ramène à conclure que l'activité antibactérienne dépend de la concentration des extraits, plus au moins important selon la nature de la souche utilisée, la méthode utilisée influe aussi les résultats. Elle dépend aussi de la répartition géographique de la plante, la nature de sol, la période de récolte et la technique d'extraction.

De nombreuses études *in vitro* ont confirmés que les composés phénoliques sont des agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes. En effet certains quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas

vis à vis des bactéries à Gram négatif [48]. De plus, des récentes études ont montré que les coumarines et les tanins exercent plusieurs activités antimicrobiennes [49-50].

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par l'absence de ces métabolites secondaires dans l'extrait phénolique de la partie aérienne de la menthe poivrée d'après les résultats des tests phytochimiques d'identification. Ceci nous ramène à conclure que l'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires.

2-5-2-3-Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des polyphénols de la menthe poivrée

2-5-2-3-1- La lecture des CMI

La CMI, pour un germe donné correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu et dans notre cas à la plus petite dilution ne montrant pas de croissance microbienne après incubation.

Tableau 18 : Les résultats de CMI pour les germes testés.

Dilution Souches microbiennes	S1				S2			
	1%	0.5%	0.25%	0.125%	1%	0.5%	0.25%	0.125%
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i>	-	-	-	-	+ CMI	-	-	-

- : présence de la souche microbienne.

+ : absence de la souche microbienne.

Pour la S1, toutes les souches bactériennes et fongiques sont résistantes donc il y a pas de CMI, Par contre la S2, les souches bactériennes *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont résistantes alors que la souche fongique *Candida Sp* il est sensible à 1%.

Ces résultats ont montré que l'extrait phénolique de MP n'a pas d'efficacité sur les (03) souches bactériennes sauf sur la souche fongique *Candida Sp*.

CMI=1

NB : les figures d'évaluation de l'activité antibactérienne sont indiquées en annexe n° 4.

2-5-2-3-2- La lecture de CMF

La dilution égale à la CMI est transférée sur une boîte sans extrait phénolique.

Tableau 19 : résultat de la CMF

Dilution	1%
Souche fongique	-
Candida Sp	CMF

- : absence de pousse microbienne pour un disque.

3- Calcul de rapport CMF/CMI**Tableau 20 : Rapport CMF/CMI.**

Souche fongique	CMF/CMI	Interprétation
Candida Sp	1	Bactéricide

Le résultat à montré que l'extrait phénolique de la menthe poivrée peut être qualifié de bactéricide et fongique sur la souche utilisée.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser les plus simples techniques analytiques en passant de l'extraction des polyphénols aux outils analytiques de base dans l'étude des substances les plus intéressantes contenues dans une plante.

En outre, ce travail nous a permis de quantifier les composés phénoliques en utilisant les techniques universelles appropriées après avoir effectué des analyses chromatographiques analytiques de ces composés (polyphénols, flavonoïdes,...etc.) contenus dans cette plante. Les résultats ont montré une très forte teneur en composés et par conséquent, une forte activité antioxydant mesurée par différentes méthodes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH°, le pouvoir réducteur, et le piégeage du radical peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Par contre, l'extrait phénolique de la plante étudiée a montré une faible activité antibactérienne avec des concentrations différentes, ces résultats nous ramène à conclure que la différence de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait de la plante semble être directement liée à la diversité qualitative et/ou quantitative des composés qui sont présents dans l'extrait.

Les résultats obtenus sont très encourageants, notamment pour l'activité antioxydante, par conséquent, l'agro-matériau étudié peut être exploré comme source antioxydante potentielle d'origine naturelle, ces résultats aussi constituent une justification scientifique de l'usage traditionnel de la plante étudiée et confirme encore une fois la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux.

Notons enfin que ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle notamment en terme de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques, et comme les résultats obtenus *in vitro*, dans ce travail, ne constituent qu'une première étape dans la recherche des substances, de source naturelle, biologiquement actives, nous pouvons émettre certaines perspectives à envisager dans cet axe de recherche et compléter ainsi notre projet, des travaux complémentaires sont alors nécessaires pour isoler et identifier les substances bioactives responsables des activités testées, comme l'utilisation des techniques d'identification plus performantes (chromatographies couplées à des techniques spectroscopiques telles que la masse et la RMN).

Annexes

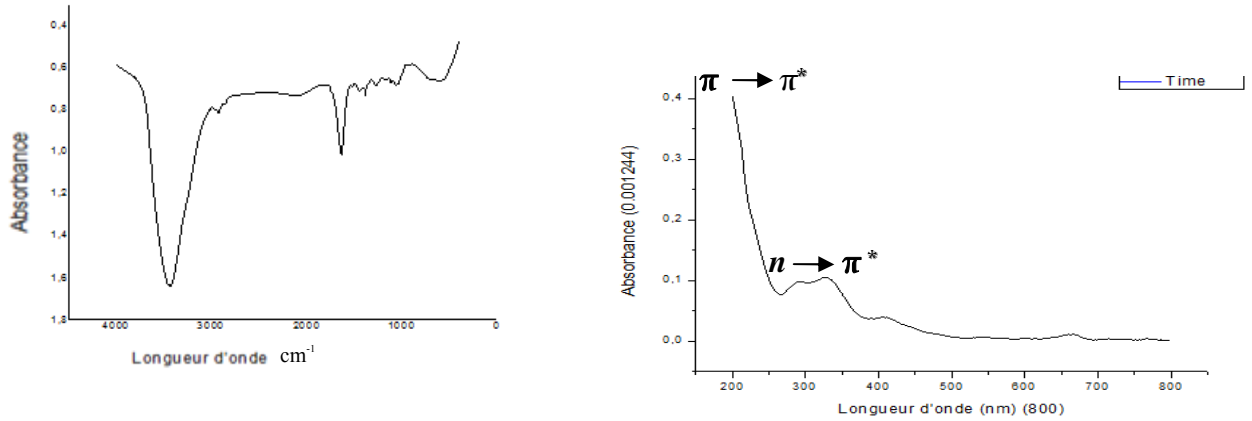
Annexe 1

Produits, Equipements, Matériels utilisés

<i>Produits</i>	<i>Equipements</i>	<i>Matériel</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Ethanol - Chloroforme - Acide sulfurique - Ferricyanide de potassium - Chlorure ferreux - Hydrogénocarbonate de sodium - Méthanol - Chlorure d'aluminium - Acide acétique - Réactif de folin-ciocalteu - Solution d'ammoniaque - Acide chlorhydrique - Tampon phosphate - Eau oxygéné - Solution éthanolique de DPPH - Acide trichloracétique - Chlorure d'aluminium - Anhydride acétique - Liqueur Fehling - Hydroxyde de sodium - Aétate de sodium - Bromure de potassium - Peroxyde d'hydrogène - DMSO - Acétate d'éthyle - n-butanol 	<ul style="list-style-type: none"> - Balance analytique - Balance technique - Etuve - Broyeur mécanique (moulin à café) - Spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETR E, UV-4211/SO) avec cuve en verre. - Evapérateur rotatif(HEIDOLPH) - Plaque chauffante - Spectrophotomètre FT-IR (spectrum Two) - Spectrophotomètre UV-Visible evolution 220(thermo scientific) 	<ul style="list-style-type: none"> - Eprouvette - Erlenmeyer - Bicher - Cristallisoir - Pipette - Verre de montre - Tube à essai - Barreau magnétique - Entonnoir - Fiole jaugée - Papier PH - Thermomètre - Spatule

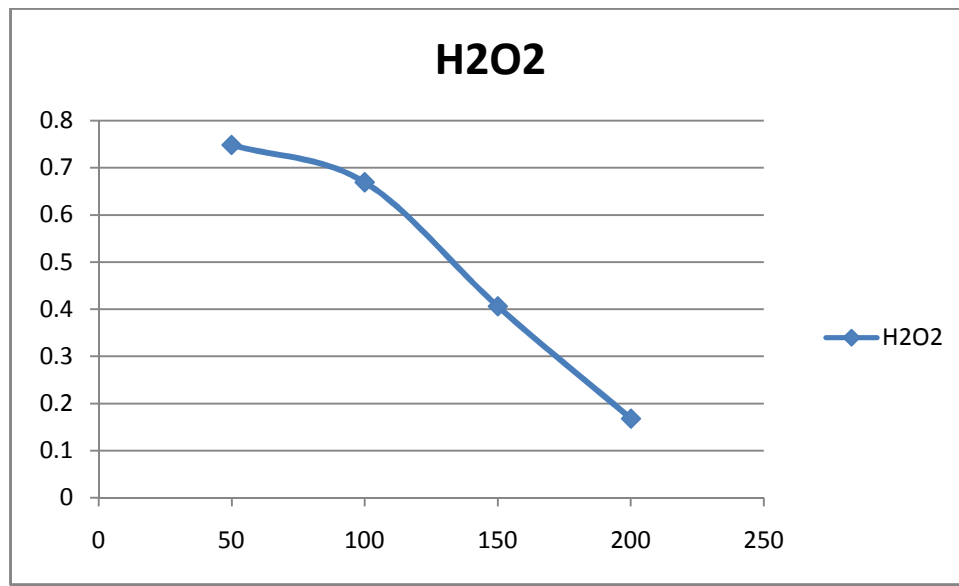
Annexe 2

1

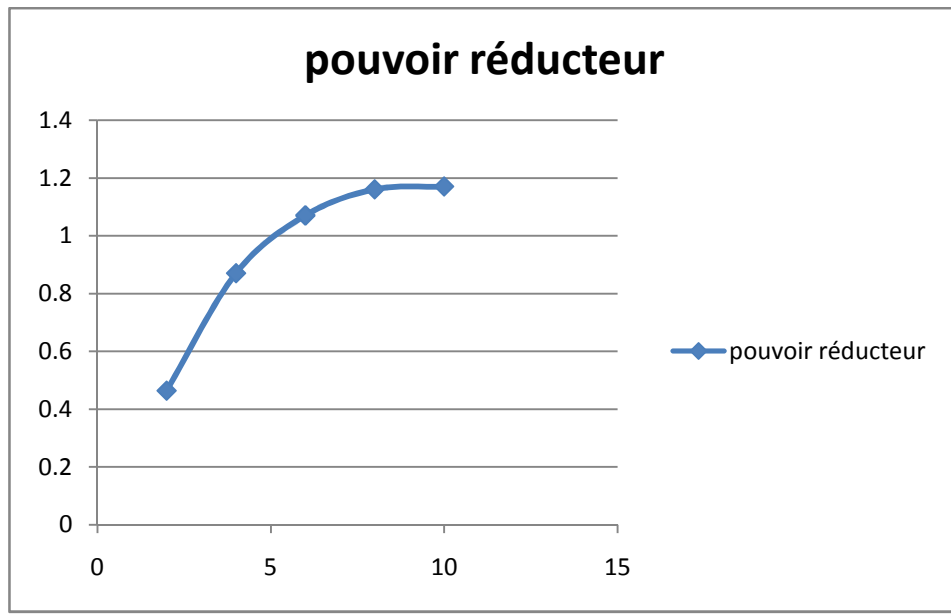


Les spectres IR et UV

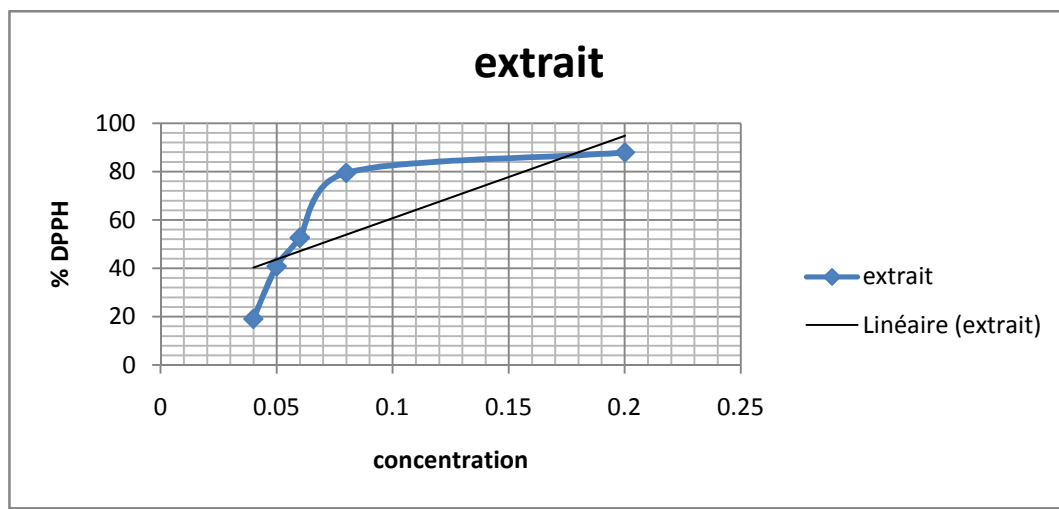
Annexe 3



Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène de l'extrait phénolique de la menthe poivrée.

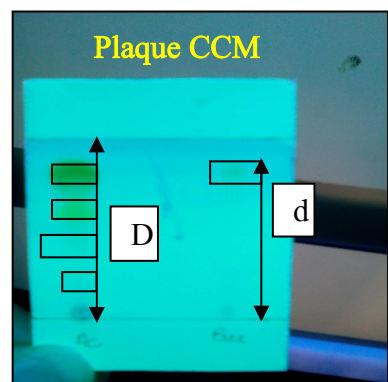
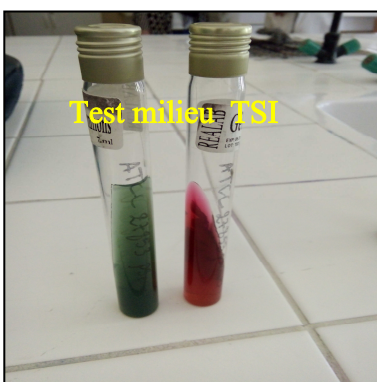
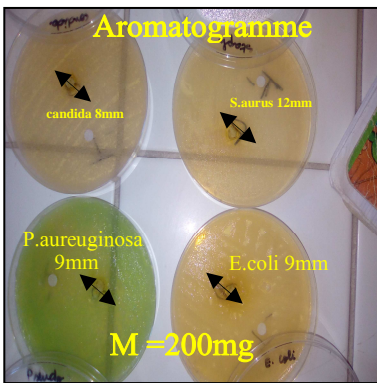
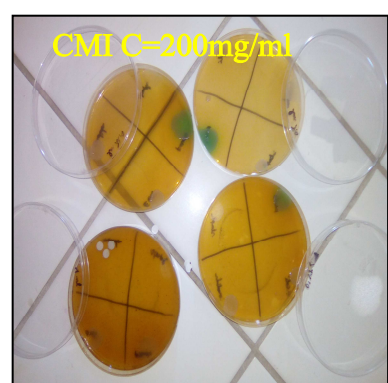
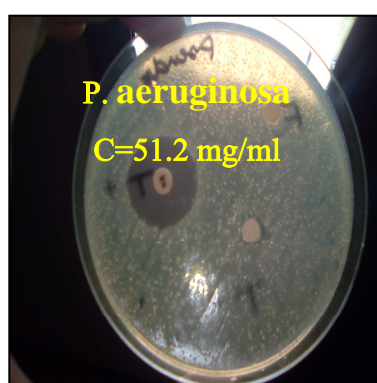
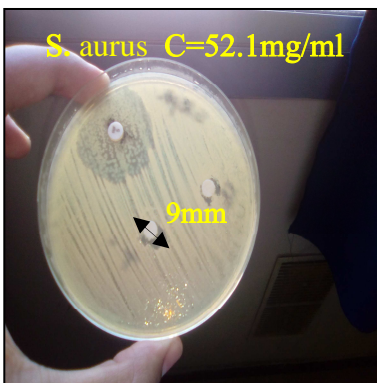
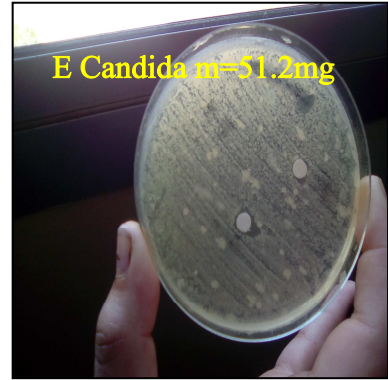
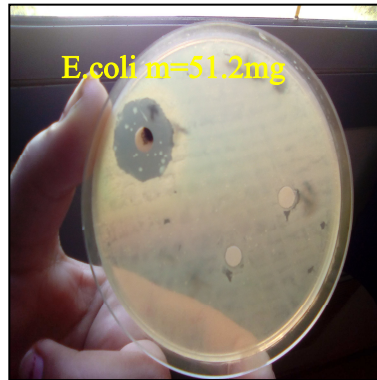


Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de la menthe poivrée.



Pourcentage d'inhibition de DPPH° par l'acide ascorbique.

Annexe 4



Annexe 5

Matériels biologiques

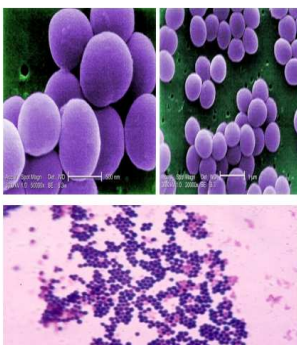
Les bactéries ont des tailles allant des cellules «naines» de 0,2 microns ou même moins à des cellules «géantes» longues de 500 microns, mais la plupart ont une dimension comprise entre 1 et 10 microns. Elles peuvent le plus souvent être observées au microscope ordinaire (grossissement de 1000 fois environ) sans avoir subi de préparation particulière (examen à l'état frais, entre lame et lamelle, de bactéries mises en suspension dans un liquide) ou après coloration.

Les levures sont des champignons unicellulaires dont la taille varie de 2 à 20 µm. La taille des champignons est donc supérieure à celle des bactéries ce qui permet facilement de les distinguer.

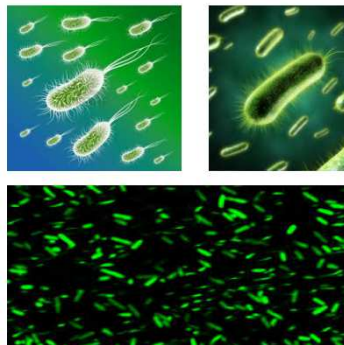
1- Souches bactériennes et fongiques

<i>Souches testées</i>	<i>Code de la souche</i>	<i>Familles</i>	<i>Pouvoir pathogène</i>
<i>Escherichia coli</i> (bacille mobile)	ATCC 25922	Enterobacteriaceae	Différentes formes de diarrhées, dysenterie, rôle des enterotoxines, de l'endotoxine, des adhésines, certains de ces facteurs sont également impliqués dans des infections des tissus profonds.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacille mobile)	ATCC 27853	Pseudomonaceae	Infection pulmonaire peut être primitive ou secondaire à une septicémie.
<i>Staphylococcus aureus</i> (cocci immobile)	ATCC 25923	Micrococcaceae	Staphylococcie cutanées, sous cutanées et muqueuses, osseuses, pulmonaire, toxiinfection alimentaire, entérocolites aiguës.

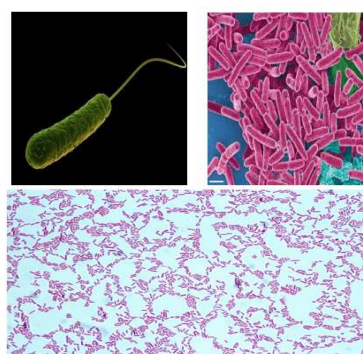
ATTC : American Type Culture Collection



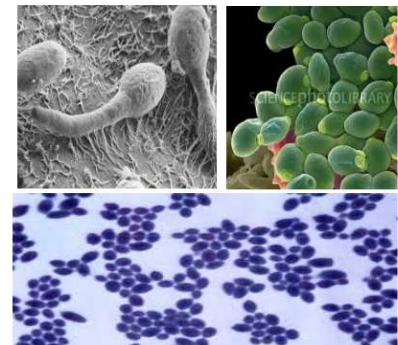
Staphylococcus aureus



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Candida Albicans

Annexe 6

	<i>Produit</i>	<i>Utilisation</i>
<i>Réactifs</i>	Méthanol DMSO	Préparation des disques
	eau physiologique	Préparation des disques
		Préparation des suspensions bactériennes
	H ₂ O ₂	Test de Catalase
	Alcool et Fuchsine	Coloration de Gram
	Colorant Violet de Gentiane	
	Colorant Lugol	
	Colorant Safranine	
	Décolorant	
	Pissette d'eau	
	huile de paraffine	
<i>Milieux utilisés</i>	Milieu Chapman	Isolement de Staphylococcus aureus
	Milieu Hektoen	Isolement d'E. coli Isolement de P. aruginosa
	Gélose Nutritive (GN) Gélose PCA	Isolement et croissance de plusieurs souches bactériennes
	Gélose Mueller- Hinton Bouillon Nutritif	Aromatogramme
	Gélose de sabouraud	Isolement des champignons et des moisissures, Réalisation de l'aromatogramme
<i>Matériel</i>	Bec bunsen Lames de verre Ecouillons Boîtes de pétris Galerie API 20 E Marker pipettes Pasteur étuve microscope pince pied à coulisse	Gélose de Mueller-Hinton (MH) : <ul style="list-style-type: none"> ⚡ Infusion de viande de bœuf 300 g/l ⚡ Hydrolysat de caséine 17,5 g/l ⚡ Amidon 1,5 g/l ⚡ Agar 17 g/l ⚡ pH 7,4 ± 0,2

Annexe 7

Coloration de Gram

a) Faire un frottis:

- + Nettoyer une lame à l'alcool.
- + Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- + Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- + Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- + Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

b) Coloration et explications: (attention aux éclaboussures, mettez des gants)

- + Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** (cristal violet) sur le frottis fixé.
- + laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- + Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis.

Déposer quelques gouttes de **lugol** sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries, laisser agir 1 minute.

- + Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à
- + Décolorer en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes). La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette, rincer à l'H₂O.
- + Contre-colorer en déposant la solution de **safranine** (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gramdécolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- + Rincer à l'H₂O.
- + Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x

Annexe 8: La galerie API 20 E

❖ Principe

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

❖ Mode opératoire

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- On introduit la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe en appuyant à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles. On distingue 3 types de remplissage :
- Pour les tests qui sont marqués par des caractères encadrés, on remplit le tube et la cupule : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests ni soulignés, ni encadrés.
- Créer une anaérobiose dans les tests qui sont marqués par des caractères soulignés: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.

Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

-Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes.

Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.

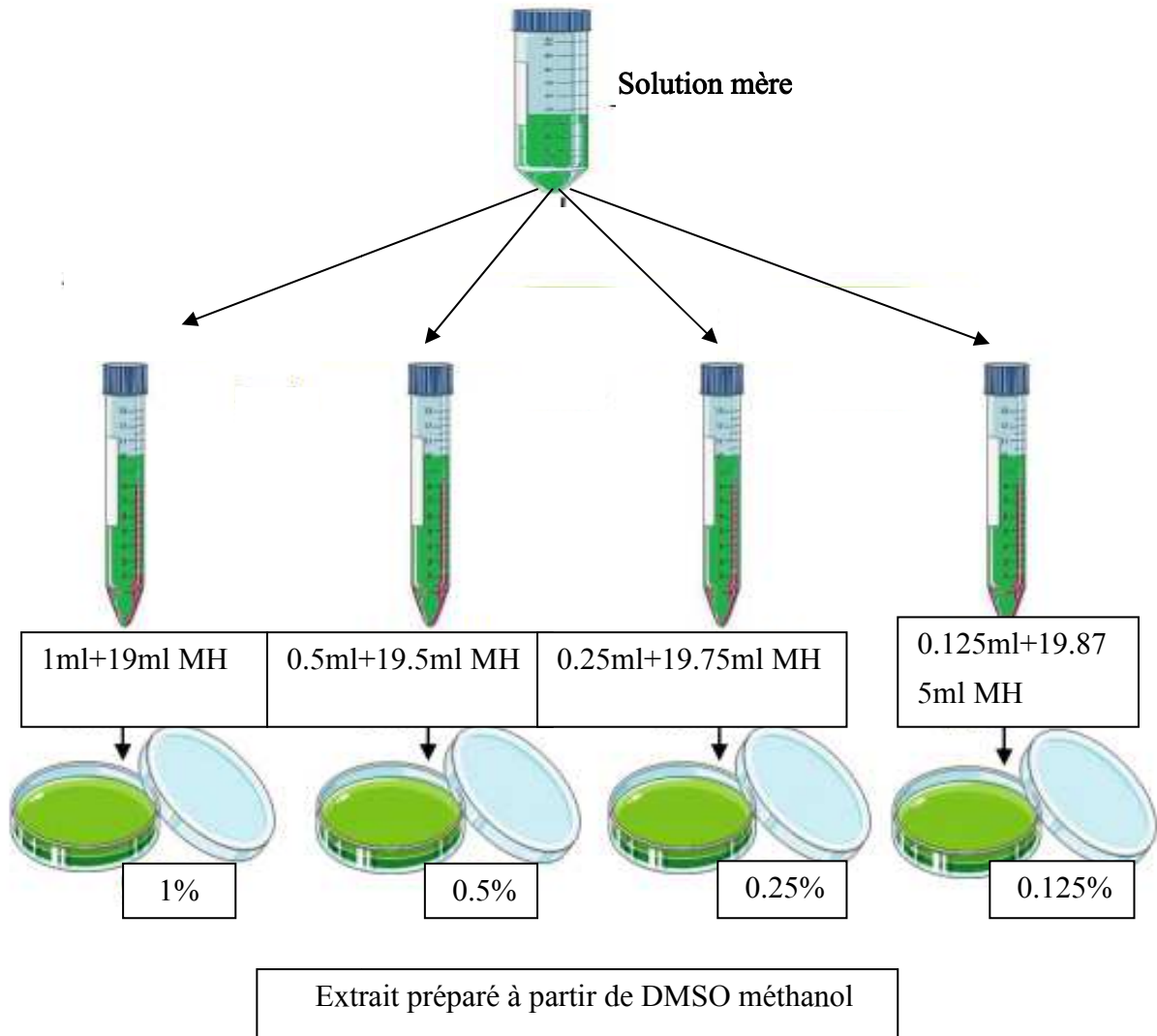
-Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.

-Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kowacks. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.



Annexe 9

Méthode de préparation des dilutions pour la CMI.



Références bibliographiques

- [1] Benayad N. 2013. Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines: Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. [Thèse] : Chimie : Université Mohammed V – Agdal Rabat.
- [2] Tucker A.O., Naczi R.F.C. 2007. *Mentha* : Un Aperçu De La Classification et les relations du Genre *Mentha*. P16-17.
- [3] Ancuceanu R., Hovaneț V.M., Anghel A.I., Dinu M ., Dune A., Ciolea M., Tolaru O., Popescu C. 2017. Variation of polyphenols and iron concentration in *Mentha x piperita* l. By development stage and soil type. *Farmacia*, 65, 5, pp 748 -754.
- [4] Hammami.S., Abdesselem M. 2005. Extraction et analyse des huiles essentielles de la menthe poivrée de la région de Ouargla. [Thèse] : chimie. Blida P69.
- [5] Mouton-Fontenille J. P. 1803. Dictionnaire des termes techniques de botanique. P228
- [6] Carlier-Loy P. 2015. *Mentha spicata* : Description et Utilisations en thérapeutique et en agriculture comme antigerminatif sur la pomme de terre. [These] : Pharmacie : Université De Picardie Jules Ver.
- [7] Michel P., Michel. L. 2007. *Secrets des plantes* .Edition Artemis.P204
- [8] Flüchiger F.A.1878. Histoire des drogues d'origine végétale. Doin, 1878. P179
- [9] Hilaire de latourette.1848. Flore de l'ancien velay : aujourd'hui partie du département de la Haute-Loire.Gaudelet.P474.
- [10] Chaumenton F.P.1830.flore médical, jean baptist joseph anne césar tyrbas de chamberet.panckoucke .P234.
- [11] Bodard P-H-H. 1810.cour de botanique médicale comparé, ou exposé des substances végétales exotiques comparées aux plantes indigènes, contenant la description des plantes, tant exotiques qu'indigènes. volume1.chez Méquignon l'ainé. P193
- [12] Achat S. 2013. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. [Thèse] : Biologie : Université A. Mira-Bejaia.
- [13] Boubekri C. 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. [Thèse] : chimie : Université Mohamed Khider – Biskra.
- [14] Tlili M. L. 2015. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). [Mémoire] : biologie : Université kasdi Merbah – Ouargla.
- [15] Michel J. 2012. Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins(Application du procédé Oakscan®).[Thèse] : Œnologie : Université Bordeaux Segalen.
- [16] M. Assad. 2015. Fractionnement des complexes lignines-polyphénols polysaccharide issus de déférentes biomasses lignocellulosique par estrusionb BI-VIS et séparation chromatographique. [Thèse] : sciences des agro ressources. Toulouse.
- [17] Béhal A. 1897. *Traité de chimie organique : d'après les théories modernes*, Auguste Béhal, volume 2. P 277.
- [18] Gotti G. 2013. Modification de surface électrochimique par des nanoparticules d'or pour la détection de molécule impliquées dans le stress oxydant. [Thèse] : Université de Toulouse.

- [19] Bahi A. 2014/2015. L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat Albinos Wister : (Aspect biochimiques, immunologique et histologiques). [Thèse] : Université des Frères Menrouri Constantine
- [20] Abdou B. 2009 Contribution à l'étude de développement d'un aliment fonctionnel à base d'épices du Cameroun : Caractérisation physico-chimique et fonctionnelle. Thèse de docteur de l'INPL et docteur Ph D : université de N'Gaoundéré
- [21] KABOUCHE S. 2010. Etude de la relation du thé vert. Maladie cardiovasculaires et stress oxydant. [Mémoire de magister] : Université Mentouri- Constantine.
- [22] Bouchouka E. 2016 .Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. [Thèse] : Université Badji Mokhtar –Annaba
- [23] ANISIO F., 2005. Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponective et prostaglandines. [Thèse] : Université Lyon.
- [24] Anisio F. 2005. Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponective et prostaglandines. [Thèse] : Université Lyon
- [25] Lehout, LAIB. 2015. Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : Artemisia herba alba Asso. [Thèse] : Université des Frères Mentouri Constantine
- [26] Edoega H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005. Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. Afr.J. biotechnol., 4,7,P 685-688.
- [27] McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M., Robards K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry, 73 : P 73-84.
- [28] Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N., 2006. Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants.AFR. J. Biotechnol., 5,11, p 1142-1145.
- [29] M. Masoumeh. 2013. Evaluation of phytochemical and antioxidant activities from different parts of Nasturtium officinale R. Br. in Mazandaran. Iranian journal of plant physiology, 3,2.P 659-664.
- [30] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition 44: P 307–315.
- [31] Molyneux P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 26, 2, 2004, P 211-219.
- [32] Mami A. 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie.[thèse].microbiologie appliquée : université d'Oran.
- [33] Hayette M.P., Huynen. P., Meex C. Travaux pratiques de microbiologie générale. P34.
- [34] Denis F., Ploy M-C., Martin C., Cattoir v. Bactériologie médicale techniques usuelles.3^{ème} édition. P20.

- [35] Guillaume P.Y. 2004. La microbiologie. Les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques.
- [36] Bey F. 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactobacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. [Magister] : microbiologie alimentaire : université d'Oran Es-Senia.
- [37] Gaillot O. 2008. Identification des Entérobactéries. A review. J, Appl.Microbiol, 99, pp223-229.
- [38] Talbi M.2015. Dosage des polyphénols de la plante d'*Artemisia Campestres*.al par chromatographie HPLC .Mise en évidence de l'activité biologique.[Thèse] : Université d'Oran Ahmed Benballa.
- [39] Moukadem H.2011.ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES ESPECES *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae).[thèse]: Université Badji Mokhtar-Annaba.
- [40] Saffidine K.2015.Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus Caeruleus* L.et de plantage major L. [Thèse]:Université de Ferhat Abbas Sétif.
- [41] Mebarki N.2010 .Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne .[Thèse]: Université M'Hamed Bougara Boumerdès.
- [42] Generali Mekini I, Danijela S, Ljubenkov I, Simat V, Smole S-m, Katalini V. 2014. In vitro Antioxidant and Antibacterial Activity of Lamiaceae. Activity of Lamiaceae Phenolic Extracts, Food Technol. Biotechnol. 52(1), pp 119–127.
- [43] Nidhal M., Salih. Aswan H., Bayar., Mazin J. 2013. Antioxidant activity of dietary plants : Peppermint. Pakistan journal of nutrition, 12(6) : pp 571-574.
- [44] Fialová S., Tekel'ová D., Rendeková K., Klinčok J., Kolárik M., Kurucová K., Grančai D. 2014. The variability of secondary metabolites in *Mentha × piperita* Cv. 'perpeta' during the development of inflorescence. Acta Fac. Pharm. Univ. Comen. LXI,(2), pp. 21–25.
- [45] Fialová S. , Tekel'ová D., Rendeková K., Klinčok J., Kolárik M., Kurucová K., Grančai D. 2015. Phenolic compounds variation in *Mentha* L. species in the course of a four-years period. Acta Fac. Pharm. Univ. Comen. LXII, (Suppl IX): 2-7.
- [46] Bendjabeur S. 2012. Evaluaton du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenad *Punica granatum* L.) en vue de leur utilisation alimentaire. [thèse] : agronomie : alharrache alger.
- [47] Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical Scavenging efficiencies. Methods in Enzymology, Vol. 186, 1990, pp. 343-355.

- [48] Riffel A, Medina L-F, Stefani V, Santos R-C, Bizani, Brandelle (2002). In vitro antibacterial Activity of a new series of 1, 4-naphthaquinones. Brazilian journal of medical and biological research. 35(7) : 811-818.
- [49] Benidicte F, Hooper D.C. (1998). Effect of mutation in GRIA of topoisomerase IV, from staphulococcus aureus on quinplene. ang. 42(8): 2109- 2112.
- [50] Nguz K. (1996). Evaluation de la degradation des tannins. Phytochimiques. 225-230.

Résumé

L'extrait phénolique de la menthe poivrée à été préparé par macération (extraction par solvant). Le rendement de l'extraction été de 4.46%. L'étude chimique analytique [Tests d'identification; dosage des flavonoïdes totaux (8.33mg QR/g extrait) et des phénols totaux (612.09mg AGE/g extrait), CCM et IR, UV] effectuée sur l'extrait phénolique de la partie aérienne de la menthe poivrée a montée la nature phénolique de cet extrait.

L'activité antioxydante de l'extrait à été évaluée par le test de DPPH, le test de H₂O₂ et le test de PR. Les résultats étaient de 87.94% et 82.68% pour les deux premiers tests respectivement.

L'activité antibactérienne des polyphénols à permet d'évaluer l'action de l'extrait phénolique de la plante vis-à-vis les (04) souches bactériennes et fongiques testées. Notre extrait a montré une activité antibactérienne faible.

Mots clés : flavonoïdes, menthe poivrée, extraction, activité antioxydante, anti bactérienne.

Summary

The phenolic extract of peppermint was prepared by maceration (solvent extraction). The extraction yield was 4.46%. Analytical chemical study [Identification tests; total flavonoid assay (8.33mg QR / g extract) and total phenols (612.09mg AGE / g extract), TLC and IR, UV] performed on the phenolic extract of the aerial part of peppermint phenolic nature of this excerpt.

The antioxidant activity of the extract was evaluated by the DPPH test, the H₂O₂ test and the PR test. The results were 87.94% and 82.68% for the first two tests respectively.

The antibacterial activity of the polyphenols to evaluate the action of the phenolic extract of the plant vis-à-vis the (04) bacterial and fungal strains tested. Our extract showed weak antibacterial activity.

Keywords: flavonoids, peppermint, extraction, antioxidant activity, anti bacterial.