

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة المسيلة

UNIVERSITE DE M'SILA



FACULTEDES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION:ANALYSES BIOCHIMIQUES

Présenté par

SAKER Imane

Thème :

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES D'UNE
PLANTE DE LA REGION DE M'SILA *Mentha pulegium L.***

DEVANT LE JURY :

DAHDOUH Faouzi

MAA

Président

MEDJEKAL Samir

MAA

Encadreur

BOUDJELAL Amel

MCB

Examineur

BOUBAKER Hafsa

MAA

Examineur

Promotion : 2012-2013

Remerciements

Avant tout, je remercie DIEU, sans lui ce manuscrit n'aurait pu exister.

Je tiens à remercier Mr Medjekal S, Maître assistant à la faculté des Sciences, Université de M'sila, qui a bien voulu m'encadrer, je le remercie pour toute l'aide scientifique et technique qu'elle m'a apportée au cours de la réalisation de ce travail.

Je remercie les membres de jury (Dahdouh Faouzi, Boudjelal Amel, Boubaker Hafsa) d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements, et ma reconnaissance toute particulière et gratitude, qui ne sera jamais concrètement exprimé à l'égard de Mme Boudjelal Amel, Maître de conférences, Université de M'silaje n'oublierai jamais votre aide et votre encouragements aux moments difficiles.

Je remercie également Mr Sghiri Kamel, responsables des laboratoires pédagogiques, sans oublie de remercier Mlle Baeli Faiza, ingénieur de laboratoire de biochimie, Université de M'sila pour sa gentillesse, ces aides et ces conseils merci de tous mon cœur.

Mes plus vifs remerciements à toutes mes amies de la promotion pour leur soutienmoral tout au long de ces années mémorables.

Je remercie également, toute personne ayant contribué de près ou de loin à laréalisation de ce travail.

Dédicaces

A mon père pour tout ce qu'il a fait de moi, pour son amour, pour toute la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

A ma mère pour ses sacrifices, pour son amour, ses encouragements et ses prodigieux conseils.

A mes sœurs Ilhame et la petite Maram pour les moments agréables que nous avons passés ensemble.

A mes frères Youcef et Mohammad.

A mes ami(e)s: Mouna, rofia, Naoual, Assia, Nessrine, Nanaa, Nardjes, Sabrina Mourad, Yacine, Walid, Amine, Mousaab, Youcef, Hicham, Hossam, Zaki

A mes cousines : Soulaf, Asma, Ismahane, Fatima, Inasse.

A tous ceux qui me sont chers.

Abréviations

8-OH-2-DG : 8 hydroxy-2-déoxyguanosine.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AGPI : Les acides gras polyinsaturés.

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdiens.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.

CCM : Chromatographie sur couche mince

Cox 3 : Cyclooxygénase 3

Cox-2b : Cyclooxygenase 2b

DPPH : Diphényl pycryl hydrayl.

EAc : Extrait d'acétate d'éthyle.

EAG : Equivalent acide gallique.

EAg : Extrait aqueux.

EBr : Extrait brut.

ECh : Extrait chloroformique.

EQ : Equivalent quercetine.

ERO : Espèces réactifs de l'oxygène.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

GPx : Gluthation peroxydase.

HCL : Acide chloroformique.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane.

Inf : Infusé.

IP : Intra périnéale.

M.S : Matière sèche.

MeOH : Méthanol.

Mg : Magnésium.

NAD : Nicotinamide adénine dinucleotide.

NH₄OH : Ammoniaque.

PGE₂ : Prostaglandine 2.

RF : Rapport frontal.

RL : Radical libre.

SD : Déviation standard.

SOD : Superoxydase dismutase.

UV : Ultraviolet.

Liste des figures

Figure 01 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	4
Figure 02 : Principales classes de dommages de l'ADN.....	7
Figure 03 : Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	7
Figure 04 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	11
Figure 06 : <i>Mentha pulegium</i> L.....	16
Figure 07 : Protocol d'extraction des flavonoïdes.....	25
Figure 08 : Rendement d'extraction des différents extraits en %.....	35
Figure 09 : Teneurs en composés phénoliques des extraits de menthe pouliot.....	41
Figure 10 : Teneurs en Flavonoïdes des extraits de menthe pouliot.....	43
Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	44
Figure 12 : Effet analgésique de paracétamol et de Menthe pouliot 100-200mg/kg....	47

Liste des tableaux

Tableau 01 : Taxonomie de la Menthe pouliot.....	17
Tableau 02 : Quelques préparations thérapeutiques de la menthe pouliot.....	18
Tableau 03 : Composition chimique d'huiles essentielles de la littérature de différentes Origine.....	19
Tableau 04 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	26
Tableau 05 : Composés phénoliques identifiés par CCM (Markham, 1982).....	28
Tableau 06 : Résultats des tests préliminaires de <i>Mentha pulegium</i>	32
Tableau 07 : Caractéristiques et rendements en % des extraits phénoliques obtenus par macération et au Soxhlet à partir de la plante <i>Mentha pulegium</i>	34
Tableau 08 : CCM sous UV et leur interprétation selon Markham, 1982.....	36
Tableau 09 : Résultats de CCM des 3 meilleurs systèmes solvants.....	39
Tableau 10 : Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de <i>Mentha pulegium</i>	40
Tableau 11 : Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de Menthe pouliot.....	42
Tableau 12 : IC50 des différents extraits de <i>Mentha pulegium</i>	44
Tableau 13 : Activités analgésiques de paracétamol et de l'infusé de menthe pouliot.....	46

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

1^{ère} partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les radicaux libres.

1.1.	Les radicaux libres.....	2
1.1.1.	Définition	2
1.1.2.	Principaux radicaux libres	2
	• L'anion superoxyde	2
	• Le peroxyde H ₂ O ₂	2
	• Le radical hydroxyle.....	2
	• L'oxygène singulet	3
1.1.3.	L'origine des radicaux libres	3
1.1.3.1.	L'origine endogène	3
	• NAD(P) H oxydase.....	3
	• La xanthine oxydase/désydrégénase.....	3
	• Lors du métabolite de l'acide arachidonique.....	4
1.1.3.2.	L'origine exogène.....	4
1.2.	Stress oxydant.....	5
1.2.1.	Définition.....	5
1.2.2.	Conséquences du stress oxydant.....	5
1.2.2.1.	Oxydation des protéines.....	5
1.2.2.2.	Les altérations de l'ADN.....	5
1.2.2.3.	Peroxydation lipidique.....	6
1.3.	Les antioxydants.....	6
1.3.1.	Définition.....	6
1.3.2.	Caractéristiques es antioxydants	8
1.3.3.	Origine des antioxydants.....	8
1.3.3.1.	Les antioxydants endogènes.....	8
	• Système de défense primaire.....	8
	• Système de défense secondaire.....	8
1.3.3.2.	Les antioxydants naturels.....	8
	• Vitamine E (α -tocophérol).....	8
	• Vitamine C (acide ascorbique).....	9
	• Les caroténoïdes.....	9
	• Les polyphénols.....	9
1.3.4.	Mécanismes d'action des antioxydants.....	10

Chapitre II : La douleur et l'effet antalgique

2.1.	La douleur	12
2.1.1.	Définition.....	12
2.1.2.	Caractéristiques.....	12
2.1.3.	Classification.....	12
2.1.3.1.	Selon le type.....	12
2.1.3.2.	Selon l'intensité.....	12
2.1.3.3.	Selon la durée.....	13
2.1.3.4.	Selon le siège.....	13
2.1.4.	Etiologie.....	13
2.2.	Les antalgiques.....	13

2.2.1.	Définition.....	13
2.2.2.	Classification.....	13
	• Antalgiques centraux.....	13
	• Antalgiques périphériques.....	13
2.2.3.	Mécanisme d'action.....	14
2.3.	Tests de l'activité antalgique.....	14
2.3.1.	Test à la queue.....	14
2.3.2.	Test à plaque chauffante (Hot plat test).....	14
2.3.3.	Test de torsion (Writhing test).....	14

Chapitre III: La plante d'étude *Mentha pulegium* L.

3.1.	Famille des Lamiaceae	15
3.1.1.	Présentation botanique et géographique.....	15
3.1.2.	Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel.....	15
3.1.3.	Présentation du genre <i>Mentha</i>	15
3.2.	La plante d'étude : <i>Mentha Pulegium</i>	15
3.2.1.	Nomenclature.....	16
3.2.2.	Classification.....	16
3.2.3.	Description botanique	17
3.2.4.	Air et répartition	17
3.2.5.	Usages traditionnels	17
3.3.	Phytochimie.....	18
3.3.1.	Les huiles essentielles	19
3.3.2.	Autres composants	19
3.4.	Pharmacologie	19
3.4.1.	Activité antibactérienne	19
3.4.2.	Activité antioxydante	20
3.4.3.	Activité antifongique	20
3.4.4.	D'autres activités.....	20

2^{ème} partie : Matériel et méthodes

Chapitre IV : Matériel et méthodes.

4.1.	Matériel végétale.....	21
4.1.1.	Origine	21
4.1.2.	Traitement préliminaire de la plante	21
4.1.3.	Broyage.....	21
4.2.	Tests préliminaires	21
4.2.1.	Préparation des extraits	21
4.2.2.	Les tests phytochimiques	21
	• Polyphénols.....	21
	• Flavonoïdes	21
	• Tanins.....	22
	• Saponosides.....	22
	• Anthocyanes.....	22
	• Les alcaloïdes.....	22
	• Coumarines.....	22
4.3.	Extraction des principes actifs.....	22
4.3.1.	Extraction des polyphénols.....	22
4.3.1.1.	Principe.....	23
4.3.1.2.	Protocole.....	23

4.3.2.	Extraction des flavonoïdes.....	23
4.3.2.1.	Principe.....	23
4.3.2.2.	Protocole.....	23
4.3.3.	Détermination des rendements.....	24
4.4.	Analyses des extraits.....	26
4.4.1.	Analyse qualitatif.....	26
4.4.1.1.	Chromatographie sur couche mince.....	26
4.4.2.	Analyse quantitatif.....	28
4.4.2.1.	Dosage des polyphénols.....	28
4.4.2.2.	Dosage des flavonoïdes.....	29
4.5.	Les activités biologiques.....	29
4.5.1.	L'activité antioxydante (<i>in vitro</i>).....	29
4.5.2.	L'activité antalgique (<i>in vivo</i>).....	30
4.5.2.1.	Choix des animaux.....	30
4.5.2.2.	Principe.....	30
4.5.2.3.	Protocole.....	30

3^{ème} partie : Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion.

5.1.	Tests préliminaires.....	32
5.2.	Extraction des principes actifs.....	33
5.2.1.	Extraction des polyphénols.....	33
5.2.2.	Extraction des flavonoïdes.....	33
5.2.3.	Calculs des rendements.....	34
5.3.	Analyses des extraits.....	35
5.3.1.	Analyse qualitative.....	35
5.3.1.1.	Chromatographie sur couche mince.....	35
5.3.2.	Analyse quantitative.....	40
5.3.2.1.	Dosage des polyphénols.....	40
5.3.2.2.	Dosage des flavonoïdes.....	42
5.4.	Les activités biologiques.....	43
5.4.1.	L'activité antioxydante.....	43
5.4.2.	L'activité analgésique.....	45
Conclusion et perspectives.....		48
Références bibliographiques		50
Annexes.		

Introduction

INTROCUCTION

Depuis l'antiquité, l'humanité a utilisé les plantes pour traiter les maladies, sans savoir à quoi étaient dus leurs effets bénéfiques.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments décroît avec le temps ce qui oriente les chercheurs scientifiques à faire des études approfondies sur la composition chimique de la plante en métabolites secondaires et leurs action thérapeutique.

L'un des problèmes plus abondantes dans le monde biologique et médicale est le stress oxydatif, c'est une situation où la cellule ne peut plus résister la production d'une manière exhaustive des radicaux libre toxique ce qui mène à plusieurs maladies dangereuses tels que le cancer.

Les radicaux libres sont toujours présent dans notre organisme, car l'oxydation est une partie de la vie aérobie de notre métabolisme, mais tous à des limites, car une superproduction de ces espèces peut être néfaste pour l'organisme.

La douleur est une sensation indésirable, c'est pour cela on observe la présence d'une variété assez importante des analgésiques dans le marché pharmaceutique, mais la recherche ne cesse de se développer dans le but d'obtenir toujours le mieux.

Les plantes médicinales aromatiques constituent une source essentielle de substance bioactifs à des propriétés biologiques divers (antioxydants, antibactérienne...etc).

Mentha pulegium L, est une plante aromatique répandue dans l'Afrique du nord, l'Europe et le moyen orient, elle est utilisée traditionnellement comme carminatif, antiseptique...etc, et aussi elle participe au quelque recette de cuisine comme aromatisant puisque elle est riche en huiles essentielle ce qui lui donne l'odeur désagréable.

Notre travail porte sur l'étude des activités biologiques des extraits de la partie aérienne de *Mentha pulegium* à savoir : l'évaluation les activités antioxydante et analgésique.

Chapitre I :
Généralité sur les radicaux
libres

Chapitre I : Généralités sur les radicaux libres.

1.1. Les radicaux libres :

1.1.1. Définition :

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié sur l'orbitale externe. Ces électrons non appariés rendent ces espèces très instables et donc très réactives et pour se stabiliser, elles vont tenter d'apparier leur électron célibataire [33]. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) [21].

1.1.2. Principaux radicaux libres :

- **L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$**

Est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron. C'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire [29].

L'anion superoxyde joue un rôle très important dans la génération des autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle $\cdot OH$, et l'oxygène singulet O_2 [73].



- **Le peroxyde: H_2O_2**

Le peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ERO), même s'il n'a pas une structure radicalaire, car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs [33].

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde, la dismutation enzymatique est catalysée principalement par le superoxyde dismutase (SOD) [57].



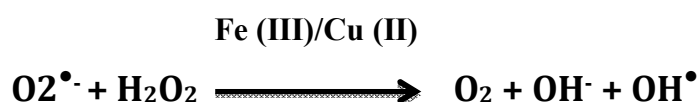
- **Le radical hydroxyle : $\cdot OH$**

Est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques [55].

Le radical hydroxyle (OH^\bullet) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton [71].



H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH^\bullet , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss [71].



• **L'oxygène singulet: $^1\text{O}_2$**

Est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines [56].

1.1.3. L'origine des radicaux libres :

1.3.1. L'origine endogène :

Les systèmes biologiques les plus simples générant des ERO, sont les constituants cellulaires solubles capables d'activer l'oxygène moléculaire, lors des réactions d'autooxydation. Ce groupe comprend, parmi d'autres, des thiols, des hydroquinones, des flavines, des catécholamines, des tetrahydropterines, des hémoprotéines, et des métaux de transition.

Mais la production des ERO dans les cellules mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et découle dans plusieurs sources possibles (Figure 01). Il s'agit principalement de :

- **NAD(P) H oxydase** qui est une enzyme membranaire, utilisant **NAD(P) H** comme substrat et génère $\text{O}_2^{\bullet-}$.
- **La xanthine oxydase/déshydrogénase** peut générer $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 en utilisant la xanthine ou l'hypoxanthine et **NADH** comme substrat [46].

- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries (Centrale énergétique de la cellule) par voie enzymatique en molécule non toxique comme H₂O. Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde O₂^{•-} [44].

1.3.2. L'origine exogène :

Les EOR sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la pollution (ex.: oxydes d'azote), l'absorption d'alcool ou de certains médicaments (ex.: catécholamines), l'exposition prolongée au soleil et le tabagisme sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction d'EOR dans notre organisme [55].

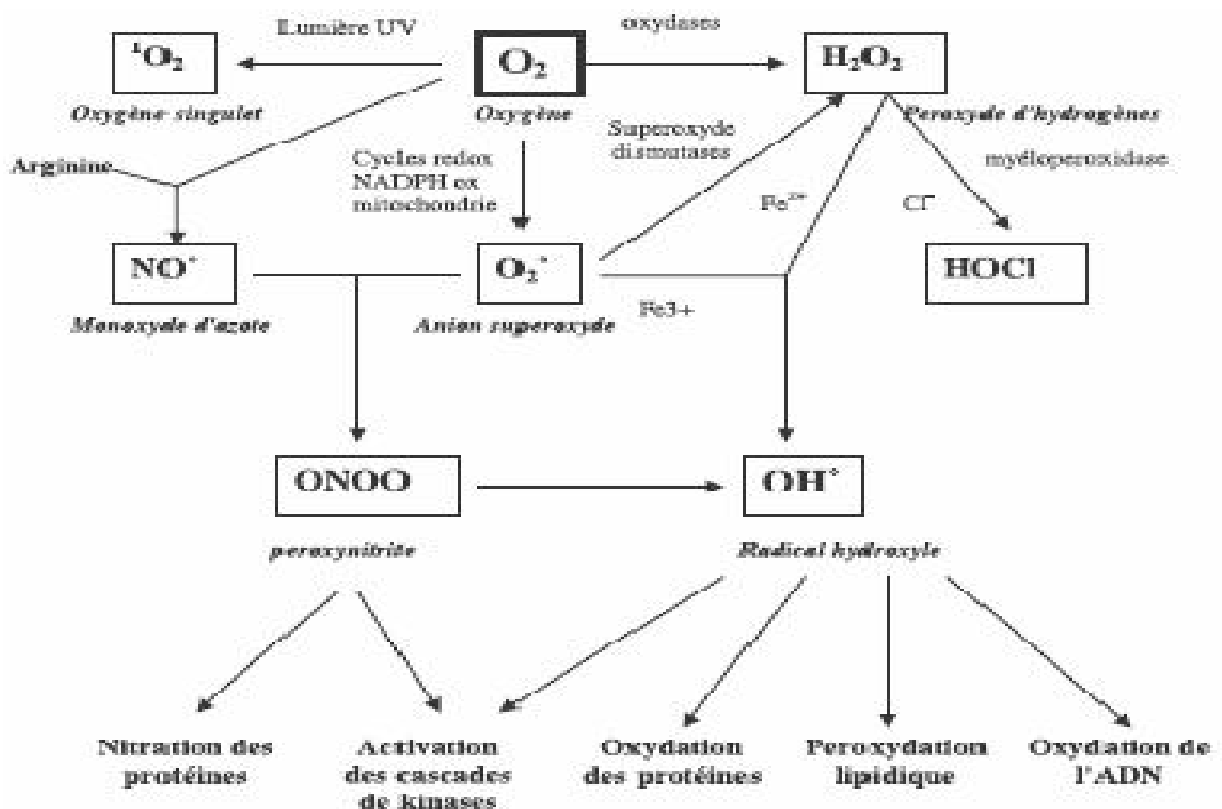


Figure 01 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie [21].

1.2. Stress oxydant :

1.2.1. Définition :

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre, entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes [27].

1.2.2. Conséquences du stress oxydant :

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides [39].

1.2.2.1. Oxydation des protéines :

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraîne des modifications structurales des protéines [56].

En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues vulnérables à l'action des protéases. Lors d'un stress oxydatif important, les cellules sont incapables d'éliminer par protéolyse les protéines oxydées accumulées, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés [42].

La modification des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO est à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés et la perte de groupes sulfhydriles critiques [35].

1.2.2.2. Les altérations de l'ADN :

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR [49]. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement [51].

Selon la source des agressions, l'ADN est endommagé de différentes façons. On peut noter quatre classes principales de dommages : les coupures simples et doubles brins, les

bases modifiées comme la 8-OHdG qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques (figure 02) [56].

1.2.2.3. Peroxydation lipidique :

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) comme l'acide linoléique ou l'acide arachidonique sont les cibles privilégiées des ERO, qui conduisent à la formation des peroxydes lipidiques [9]. Ces derniers se comportent comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire) [51].

Une attaque radicalaire, par le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Une réaction en chaîne se produit conduisant à la transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué.

Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles (figure03) [79].

1.3. Les antioxydants :

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelés « antioxydants » [67].

1.3.1. Définition :

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat, et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire [79].

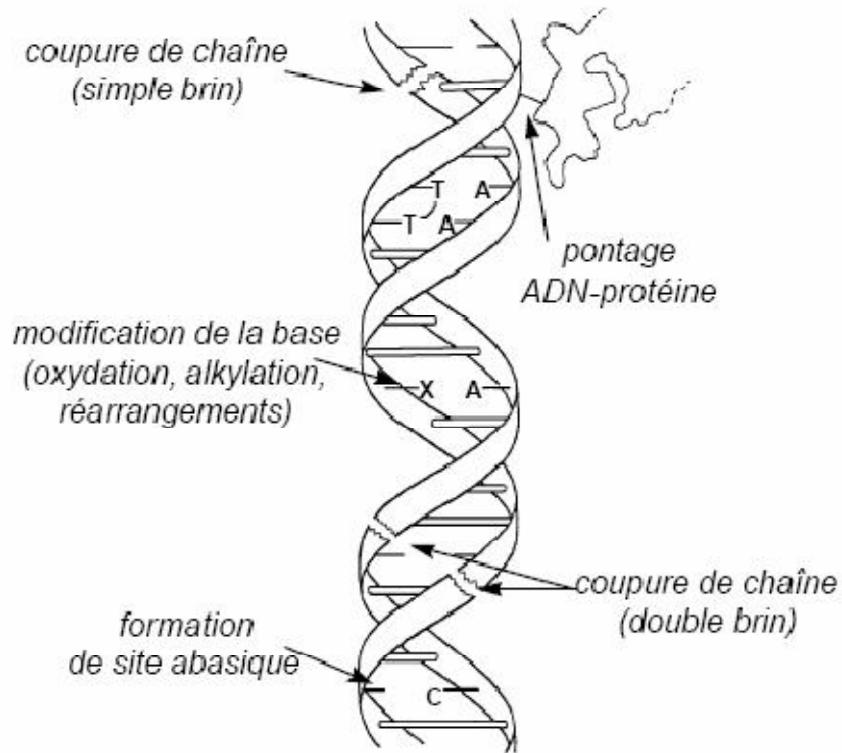


Figure 02: Principales classes de dommages de l'ADN. [51]

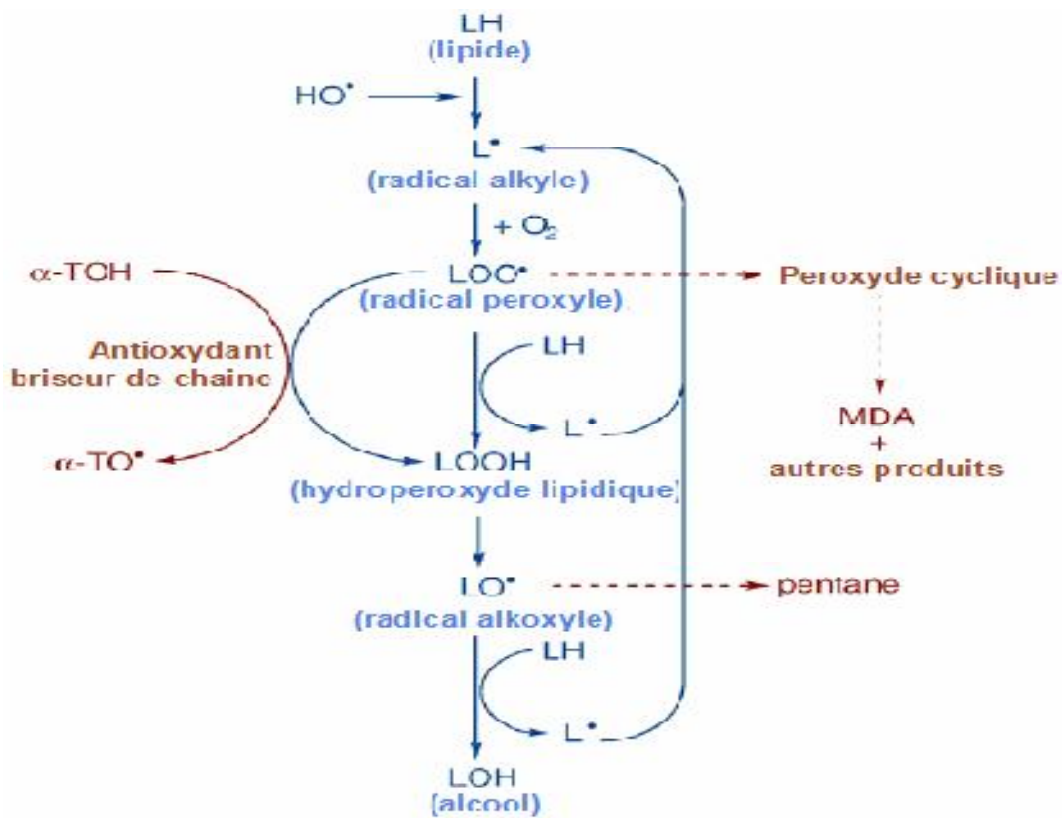


Figure 03 : Les trois étapes de la peroxydation lipidique. [65]

1.3.2. Caractéristiques des antioxydants :

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes [76, 17] :

- ✓ il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques.
- ✓ Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé.
- ✓ L'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante.
- ✓ La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

1.3.3. Origine des antioxydants :

1.3.3.1. Les antioxydants endogènes :

Les défenses antioxydantes de l'organisme peuvent se diviser en:

- **un système de défense primaire :** composé d'enzymes et de substances antioxydantes
 - ✓ *La superoxyde dismutase (SOD) :* diminue la durée de vie de l'anion superoxyde O_2^- .
 - ✓ *La catalase :* transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau.
 - ✓ *La glutathion peroxydase (GPx) :* détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
 - ✓ *Les molécules piègeurs :* le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone...etc.
- **Un système de défense secondaire :** composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases [60].

1.3.3.2. Les antioxydants naturels :

- **Vitamine E : (ou α -tocophérol)**

Est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de

vieillessement [50]. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant [77].

La vitamine E n'est pas biosynthétisée. Elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. On la trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine, les poissons gras [4].

- **Vitamine C : (ou acide ascorbique)**

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vitamine C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO[•] ou O₂^{•-}. Elle peut recycler l' α -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides [78]. La vitamine C est largement répandue dans les fruits [77].

- **Les caroténoïdes :**

Sont une classe de composés phytochimiques très importants, trouvés dans les légumes et les fruits, également dans le lait, Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène qui empêche l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet [26, 9].

- **Les polyphénols :**

Les antioxydants extraits de plantes, utilisés tels quels ou après modifications chimiques, imitant les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celle des composés phénoliques a donné le plus de molécules en regroupant un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et, en plus d'autres constituants, un ou plusieurs groupes hydroxyle qui leur confèrent la propriété d'antioxydants.

Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Figure 05). En plus de leur activité antioxydante, ils sont doués de plusieurs autres activités biologiques importantes [76, 66].

1.3.4. Mécanismes d'action des antioxydants :

On distingue au moins cinq modes d'intervention des antioxydants [58] :

- ✓ Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires.
- ✓ Chélation des métaux de transition.
- ✓ Désactivation des espèces oxygénées réactives.
- ✓ Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- ✓ Abaissement de la pression partielle en oxygène.

Les études ont montré que de nombreux polyphénols pouvaient agir à l'un ou l'autre de ces niveaux.

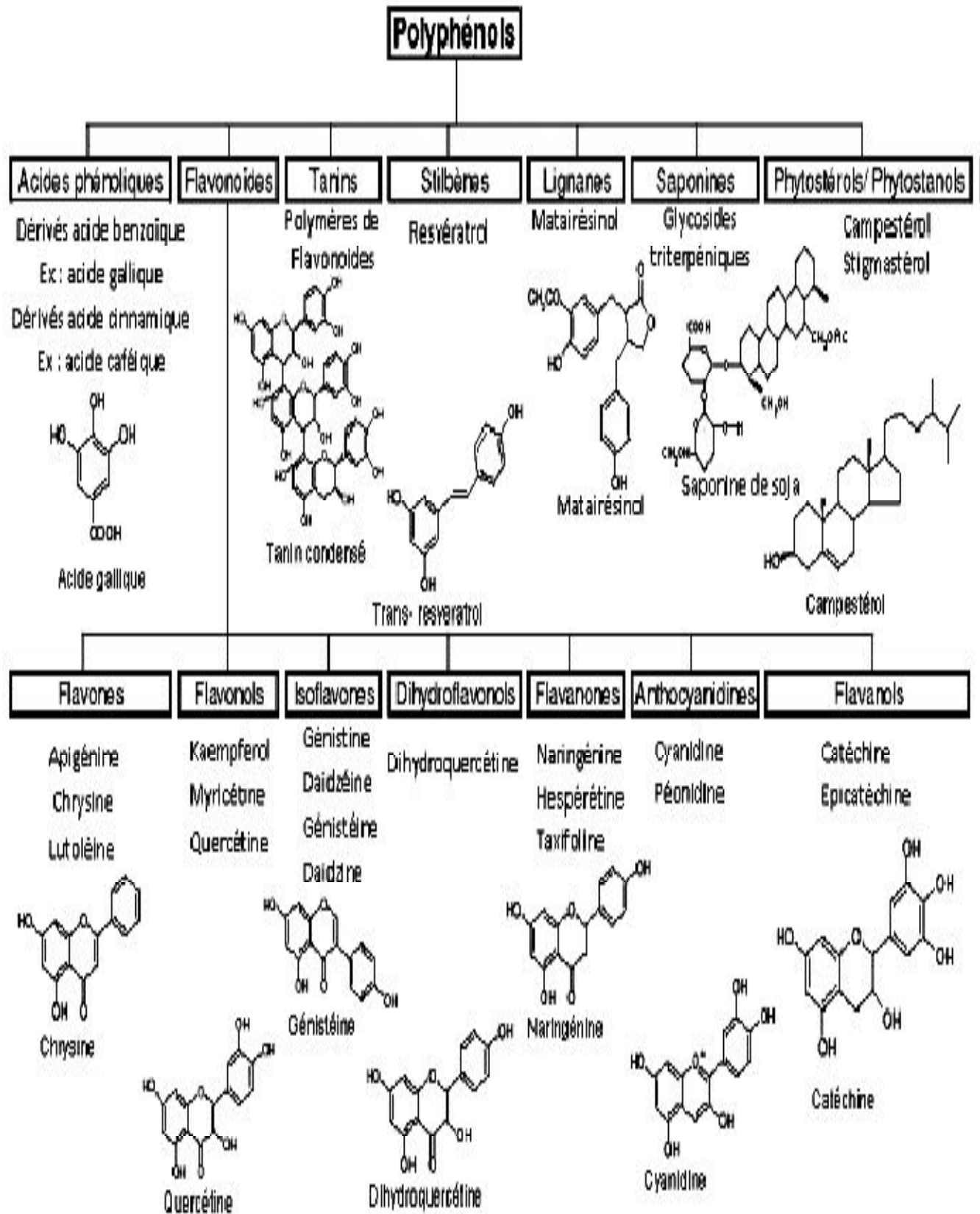


Figure 04 : Les différentes classes des composés phénoliques. [45]

Chapitre II :

La douleur et l'effet antalgique

La douleur et l'effet antalgique.

2.1. La douleur :

2.1.1. Définition :

La Douleur a été définie comme une expérience sensorielle et émotive désagréable, associée à des lésions tissulaires présentes ou potentielles ou décrites comme telles [47].

Du point de vue sémiologique, la douleur est un symptôme, un signal souvent salvateur car le premier à attirer l'attention sur un phénomène pathologique ; elle peut aussi, par son intensité et sa durée, devenir un véritable syndrome, retentissant sur les grandes fonctions organiques, capable à lui seul d'aggraver l'état du malade [47].

2.1.2. Caractéristiques :

La douleur est caractérisée par un ensemble de manifestations qui sont en général des :

- *les manifestations cliniques* : troubles trophiques, œdèmes.
- *les manifestations végétatives* : vasoconstriction, mydriase, tachycardie, modification de la pression artérielle, sudation.
- *les manifestations motrices* : retrait, sursaut, fuite.
- *les manifestations psychiques* : lorsque la douleur devient souffrance, la vie psychique et affective des individus peut être complètement perturbée [37].

2.1.3. Classification :

2.1.3.1. Selon le type :

- ***Douleurs physiologiques*** : qui sont dues à une hyperstimulation des terminaisons libres. Ses stimulations sont soit mécaniques (Ex : douleurs osseuses) soit chimiques (Ex : douleurs ulcéreuses).
- ***Douleurs neurologiques*** : qui sont dues à une lésion des voies nerveuses (Ex : douleur sciatique).
- ***Douleurs psychogènes*** : ce sont des douleurs dont la cause relève du fonctionnement psychique. Elles ne répondent pas au traitement par les antalgiques [37].

2.1.3.2. Selon l'intensité :

- Douleurs légères ou faibles.
- Douleurs modérées.
- Douleurs sévères [37].

2.1.3.3. Selon la durée :

- Douleurs aiguës.
- Douleurs chroniques : durée supérieure à 3-6mois [37].

2.1.3.4. Selon le siège:

- Douleurs superficielles.
- Douleurs profondes [37].

2.1.4. Etiologie :

Les causes sont multiples :

- Causes physiques : ce sont les traumatismes, la chaleur, le froid, les rayonnements, le courant électrique.
- Causes trophiques : par défaut de vascularisation.
- Causes chimiques : ce sont les acides, les bases, les corps « étrangers » exogène ou endogène.
- Causes biologiques : ce sont les germes : les bactéries, les virus, les parasites et les champignons ; le venin ; les toxines ; le pollen [75].

2.2. Les antalgiques :**2.2.1. Définition :**

Ce sont des médicaments à action symptomatique qui atténuent ou abolissent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations [32].

2.2.2. Classification :

Deux grandes familles thérapeutiques composent cette classe pharmacologique :

- **Antalgiques centraux :**

La morphine, originaire d'une plante: *Papaver somniferum* L. exerce son effet en agissant sur des récepteurs spécifiques présents dans différentes régions du système nerveux central. Elle participe à l'analgésie et aux autres actions pharmacologiques qui y sont associées [32].

- **Analgésiques périphériques :**

Ils agissent localement au niveau du stimulus douloureux ; leur mode d'action, souvent proche, fait intervenir pour l'essentiel l'inhibition des prostaglandines. On y retrouve des antalgiques purs, des analgésiques antipyrétiques et des anti-inflammatoires [32].

2.2.3. Mécanismes d'action :

Prenons comme référence, l'antalgique le plus utilisé dans le monde le paracétamol :

➤ **Le paracétamol :**

Est l'analgésique le mieux toléré; il n'entraîne pas d'interactions significatives au plan clinique. C'est le médicament de première intention dans les refroidissements, chez le nourrisson et l'enfant, pendant la grossesse et en période d'allaitement, ainsi que dans tous les cas où les AINS sont contre-indiqués. C'est le seul analgésique à pouvoir être associé aux anticoagulants, à être utilisé en pré- et postopératoire, ainsi que chez l'hémophile [52].

L'action antalgique et antipyrétique du paracétamol résulte de son inhibition de l'activité de la cyclooxygénase-3 produite par le cortex cérébral et qui y est responsable de la synthèse de prostaglandines (Figure 5) notamment de PGE2, un médiateur central de la douleur et de la fièvre, et de la cyclooxygénase-2b produite par la moelle épinière pour la synthèse de prostaglandines médullaires en renforcement de la perception douloureuse en cas d'inflammation [1].

2.3. Tests de l'activité antalgique :

2.3.1. Test à la queue :

- **Principe :**

Réduire par des substances antalgiques, la douleur provoquée chez les rats, par stimulation d'une douleur au niveau de la queue [18].

2.3.2. Test à la plaque chauffante (Hot plate test) :

- **Principe :**

Réduire, par des substances antalgiques, la douleur provoquée en déposant une souris sur une plaque chauffante.

2.3.3. Test de torsion (Writhing test):

- **Principe:**

Réduire par des substances antalgiques, la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion [32].

Chapitre III :

*La plante d'étude Mentha
pulegium L.*

La plante d'étude : *Mentha pulegium* L.

3.1. Famille des Lamiaceae :

3.1.1. Présentation botanique et géographique :

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres répartis dans le monde entier, mais surtout dans la région méditerranéenne [25].

C'est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont des plantes herbacées ou arbrisseaux à nombreuses glandes aromatiques ; tiges quadrangulaires. Feuilles opposées, en général simples. Fleurs irrégulières (zygomorphes), en bouquets axillaires étagés, formant souvent des verticilles autour de la tige ; calice à 5 dents, parfois bilabié ; corolle bilabiée, sauf chez *Ajuga* et *Teucrium*, la lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Etamines, 4 (2 chez *Salvia*). Fruit, 4 akènes insérés à la base du calice persistant [6, 24].

3.1.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel :

Cette famille est une importante source d'huiles essentielles, d'infusion et antibiotiques pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques. On y rencontre beaucoup d'espèces cultivées comme plantes condimentaires (sauge, thym, basilic, menthe, etc...). On y trouve aussi des plantes ornementales (sauge, lavande, etc...) [40].

3.1.3. Présentation du genre *Mentha* :

Mentha, est un genre de la famille des labiées incluant 20 espèces répandues dans le monde entier. Ces plantes portent le nom d'une nymphe grecque métamorphosée en végétal [8,54]. Les menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à 4 lobes presque égaux et à 4 étamines également presque égales [22].

3.2. La plante d'étude : *Mentha pulegium*.

La plante qui a fait l'objet de notre travail est une plante médicinale aromatique utilisée par les habitants de la région de M'sila, elle est connue sous le nom de feliou (figure 06).



Figure 06: *Mentha pulegium* L. [74]

3.2.1. Nomenclature:

❖ **Nom commun :**

- *En français* : Herbe aux puces, Herbe de saint Laurent, Bléchon, Pouliot.
- *En anglais* : Pennyroyal.

❖ **Nom botanique :** *Mentha Pulegium* L.

❖ **Nom vernaculaire :**

- *En arabe* : Feliou
- *En targui ou berbère* : Afligou, Félgou, Moursal, Temarsa [13, 74].

Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces [13, 74].

3.2.2. Classification :

La classification de l'espèce *Mentha pulegium* L. est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Taxonomie de la Menthe pouliot [14].

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales ou Verbenales
Famille	Lamiaceae ou Labiées
Genre	<i>Mentha</i>
espèce	<i>Mentha pulegium</i> L.

3.2.3. Description botanique :

Mentha pulegium L. est une Herbe vivace très odorantes. Inflorescence formée de nombreux verticillastres denses, feuillés, distants. C'est une plante glabre à Calice presque bilabié. Plante de 10-30 cm très fréquente dans les lieux inondés en hiver et assez commune surtout dans le Tell [62].

Les tiges quadrangulaires, rameuses, velue, grisâtre ou glabrescente ; feuilles petites courtement pétiolées, oblongues, longues de 15 à 25 mm, crénelées sur les bords. Fleurs pédonculées, rosées ou lilacées, en verticilles nombreux tous axillaires écartés, multiflores, très compacts ; calice velu, tubuleux à gorge fermée par des poils connivents, subbilabié à 5 dents inégales, ciliées, les deux inférieures plus étroites, corolle non gibbeuse à la gorge ; carpelles ovoïdes, lisses [5].

3.2.4. Air et répartition :

La plante est très commune jusqu'à 1800m d'altitude. Dans les zones humides, près des routes, et en abondance dans les montagnes herbagées. Elle est très répandue dans l'aire méditerranéenne, l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le Nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte) [54, 74].

3.2.5. Usages traditionnels :

La partie aérienne florissante de pouliot est traditionnellement utilisée pour son effet antiseptique, et aussi comme antifatulent, carminatif, expectorant, diurétique, pour le

traitement du rhume, sinusite, cholera, intoxications alimentaire, bronchite et tuberculose, ...etc [10]. Elle fournit une huile essentielle connue sous le nom de pennyroyal. Cette dernière est utilisée outre-Atlantique comme aromatisant (fabrication des parfums et du savon) ainsi comme répulsif d'insectes [10].

Elle a aussi une utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, elle est parfois cultivée comme plante condimentaire [74]. Quelques préparations thérapeutiques de la plante sont présentées dans le tableau 02.

Tableau 02 : Quelques préparations thérapeutiques de la menthe pouliot.

Partie utilisée et préparation	Effets thérapeutiques	référence
Partie aérienne Infusion : cuillère à soupe par tasse pendant 10 min. Inhalation. Décoction : dans le lait ou du thé.	Cas de refroidissement, de rhume, de bronchite, de toux et de douleurs abdominales	[38]
Feuilles fraîches en cataplasme	Arrêt de la sécrétion lactée	[70]
L'huile essentielle : A forte dose	Un effet abortif	[38]

3.3. Phytochimie :

L'huile essentielle, les polyphénols et les terpènes sont considérés comme les principaux composés chimiques responsables de l'activité pharmacologique des espèces appartenant au genre *Mentha*. Cependant, la plupart des études ont porté sur les huiles essentielles, alors qu'il y a beaucoup moins de rapports concernant les activités biologiques des extraits polyphénoliques de ces espèces [72]. Par conséquent, le but de notre travail était

d'examiner les activités antioxydantes des extraits polyphénoliques de l'espèce *Mentha pulegium*.

3.3.1. Les huiles essentielles :

La menthe pouliot contient des huiles essentielles. C'est un liquide rouge jaunâtre, d'odeur très forte, soluble dans l'alcool, composé de 75 à 80% de pulégone liquide incolore d'odeur aromatique -qui se montre antiseptique- et de menthol, de limonène lévogyre, de dipentène [5].

Le rendement moyen en huiles essentielles a été exprimé en millilitre par rapport à 100 g de matière végétale sèche. Ce taux est de 3,30 % pour la menthe pouliot [30].

Tableau 03: Composition chimique d'huiles essentielles de la littérature de différentes Origines [74]

Constituants	Maroc	Inde et Himalaya	Egypte	Uruguay	Autriche	Grèce
menthone	0,3	8,3-8,7	-	3,6	8,0	-
isomenthone	-	3,8-4,0	-	12,9	-	-
cis-isopulégone	-	-	-	1,4	-	-
menthol	0,7	-	-	0,1	-	-
néomenthol	-	-	-	-	-	-
pulégone	80,3	65,9-83,1	43,5	73,4	-	-
pipéritone	0,9	1,3-3,2	12,2	0,1	70,0	-
pipériténone	-	-	-	0,9	-	83,7-97,2

3.3.2. Autres composants :

La menthe pouliot contient également du sucre, du tanin, des matières résineuses, pectiques, cellulosiques, une oxydase, une peroxydase, une catalase [22].

3.4. Pharmacologie :

3.4.1. Activité antibactérienne :

L'étude de Dimitrios et ces collaborateurs en 2012 a montré que l'extrait méthanolique de l'espèce *Mentha pulegium* a une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (bactérie de gram positif) [72].

3.4.2. Activité antioxydante :

L'étude de Dimitrios et ces collaborateurs en 2012 a montré que les extraits méthanoliques et aqueuses du pouliot possèdent une activité de piégeage des radicaux libres, les résultats sont en accord avec ceux montrés dans plusieurs recherches (Berselli et *al.*, et Mata et *al.*, 2007) [72].

3.4.3. Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles de *M. pulegium* a été étudié vis-à-vis de deux champignons), par Hmiri et ces collaborateurs, elle a provoqué une inhibition de la croissance d'*A. alternata* et de *P. expansum* [30].

3.4.3. D'autres activités :

Quelques effets pharmacologiques des huiles essentielles de la menthe pouliot comme l'effet abortif sur les rats, l'activité cytotoxique humaines, et son effet antioxydant sont confirmés [11].

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Chapitre IV : Matériels et méthodes.

4.1.. Matériel végétale :

4.1.1. Origine :

La plante d'étude *Mentha pulegium* a été achetée auprès d'un herboriste de la région de M'sila et elle été identifiée par une botaniste Mme ADOUI Nabila Université de M'sila.

4.1.2. Traitement préliminaire de la plante :

Les racines sont éliminées de la plante. La partie aérienne (Feuilles, Fleurs et tiges) est récupérée.

4.1.3. Broyage :

La partie aérienne est broyée, puis mis dans des bocaux hermétiques et conservé à sec à l'abri de l'humidité.

4.2. Tests préliminaires :

La poudre végétale de la plante *Mentha pulegium* a subie différentes réactions chimiques, afin de confirmer la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires.

4.2.1. Préparation des extraits :

- **Préparation d'extrait aqueux :**

10 grammes de poudre de feuilles sont mis à infuser dans 100 ml d'eau bouillon pendant 30 min. L'infusé est filtré et le filtrat ainsi obtenu constitue l'extrait aqueux.

- **Préparation de l'extrait méthanolique :**

10 grammes de poudre de feuilles sont mis à macérer dans 100ml de méthanol pendant 24 heures, le macérât est filtrée et le filtrat ainsi obtenu constitue l'extrait méthanolique.

4.2.2. Les tests phytochimiques :

- **Polyphénols :**

Quelques gouttes d'HCL, sont ajoutée à 5 ml d'infusé, en présence de polyphénols la coloration sera rouge [64].

- **Flavonoïdes :**

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. Deux (2) ml de l'extrait aqueux ont été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes [28].

- **Tanins :**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. L'apparition d'une coloration vert-foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins [28].

- **Saponosides :**

Pour rechercher les saponosides, nous avons versé, dans un tube à essais, 10 ml de l'extrait total aqueux. Le tube était agité pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indiquait la présence de saponosides [53].

- **Anthocyanes :**

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes [53].

- **Les alcaloïdes :**

Une chromatographie sur couche mince que nous appellerons CCM (gel de silice, plaque de 200 x 200 mm) est effectuée pour quelques µl d'extrait méthanolique. Le solvant de migration est AcEt / MeOH / NH₄OH 50 % (9:1:1). Après migration, les spots fluorescents à 365 nm sont pulvérisés avec le réactif de Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium). L'apparition en lumière visible de taches orange témoigne de la présence d'alcaloïdes [16].

- **Coumarines :**

1 g de poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV [16].

4.3. Extraction des principes actifs :

4.3.1. Extraction par Soxhlet :

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en œuvre pour extraire les principes actifs des plantes, parmi lesquelles on a utilisé la méthode de Soxhlet.

La méthode de Soxhlet est l'une des méthodes d'extraction solide-liquide, elle est réalisée par épuisements successifs de la poudre végétale à l'aide d'un solvant [36].

4.3.1.1. Principe :

L'appareillage comporte un chauffe-ballon, un ballon de 500 ml dans lequel le solvant est chauffé jusqu'à sa température d'ébullition et vaporisé, un réfrigérant qui condense les vapeurs et un extracteur de 250 ml à l'intérieur duquel est introduit dans une cartouche poreuse le produit à extraire (la poudre végétale) et où retombe le solvant condensé dans le réfrigérant. Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue. La solution retombe alors dans le ballon où se concentrent les extraits [36].

4.3.1.2. Protocole :

20 g de poudre végétale introduite dans la cartouche, le ballon est rempli par 400ml du solvant d'extraction, le Méthanol (Biochem) puis chauffé à 40 C° (température d'ébullition du Méthanol).

L'extraction terminée quand 6 cycles de solvant passent, la solution obtenue est filtrée sur papier filtre puis concentrée à l'évaporateur rotatif (rotavapor R-210 BUCHI) jusqu'à l'obtention d'extrait sec de polyphénol. Le résidu est pesé et gardé au congélateur jusqu'à la mise en marche des tests phytochimiques et pharmacologiques.

4.3.2. Extraction des flavonoïdes :

4.3.2.1. Principe :

Tous les flavonoïdes n'ont pas la même propriété de solubilité car certains flavonoïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool alors que d'autres ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faible [10].

4.3.2.2. Protocole :

Ce protocole d'extraction est selon la méthode de Makhram 1982 [48]. 20 g de poudre de la plante est macéré dans un mélange hydro alcoolique (méthanol /eau 80/20: V/V) pendant 72 h après dans un mélange hydro alcoolique (méthanol/eau 50/50 : V/V) à température ambiante et à l'obscurité avec renouvellement du solvant toute les 24 h, les divers extraits sont réunis et filtrés.

Après filtration des extraits hydro alcooliques, ils subissent une évaporation sous vide dans un rota vapeur (Rotavapor, Buchi 461) à une température de 35C°.

La phase aqueuse obtenue est conservée pendant 48 heures à 4C° puis filtrée. Après fractionnée par plusieurs solvants.

- **Affrontement avec l'hexane** : permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques). Surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques.
- **Affrontement avec le chloroforme** : cette étape permet d'isoler (de soutirer) les composés phénoliques simples tels que les acides phénols et les flavones lipophiles.
- **Affrontement avec l'acétate d'éthyle** : entraîne les aglycones, les mono -O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits.

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (V/V) sont mélangés énergiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz produits.

Pour chaque solvant (chaque fraction), on refait deux à trois fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés. La phase d'hexane ne renferme pas de composés phénoliques est rejetée. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec le rotavapeur et reprises dans du méthanol (4 à 5ml) pour le diagnostic chromatographique et l'activité antioxydante.

On prend aussi 4 à 5ml des phases aqueuses restantes (après plusieurs lavages) contenant les flavonoïdes non entraînés (figure 07).

4.3.3. Détermination des rendements :

Les rendements des matières extraites sont calculés par la relation suivante :

$$\text{Le taux de la matière extraite(\%)} = \frac{P_1 - P_2}{E} * 100.$$

P₁ : poids du ballon vide (g).

P₂ : poids du ballon après évaporation (g).

E : poids de l'extrait sec (g).

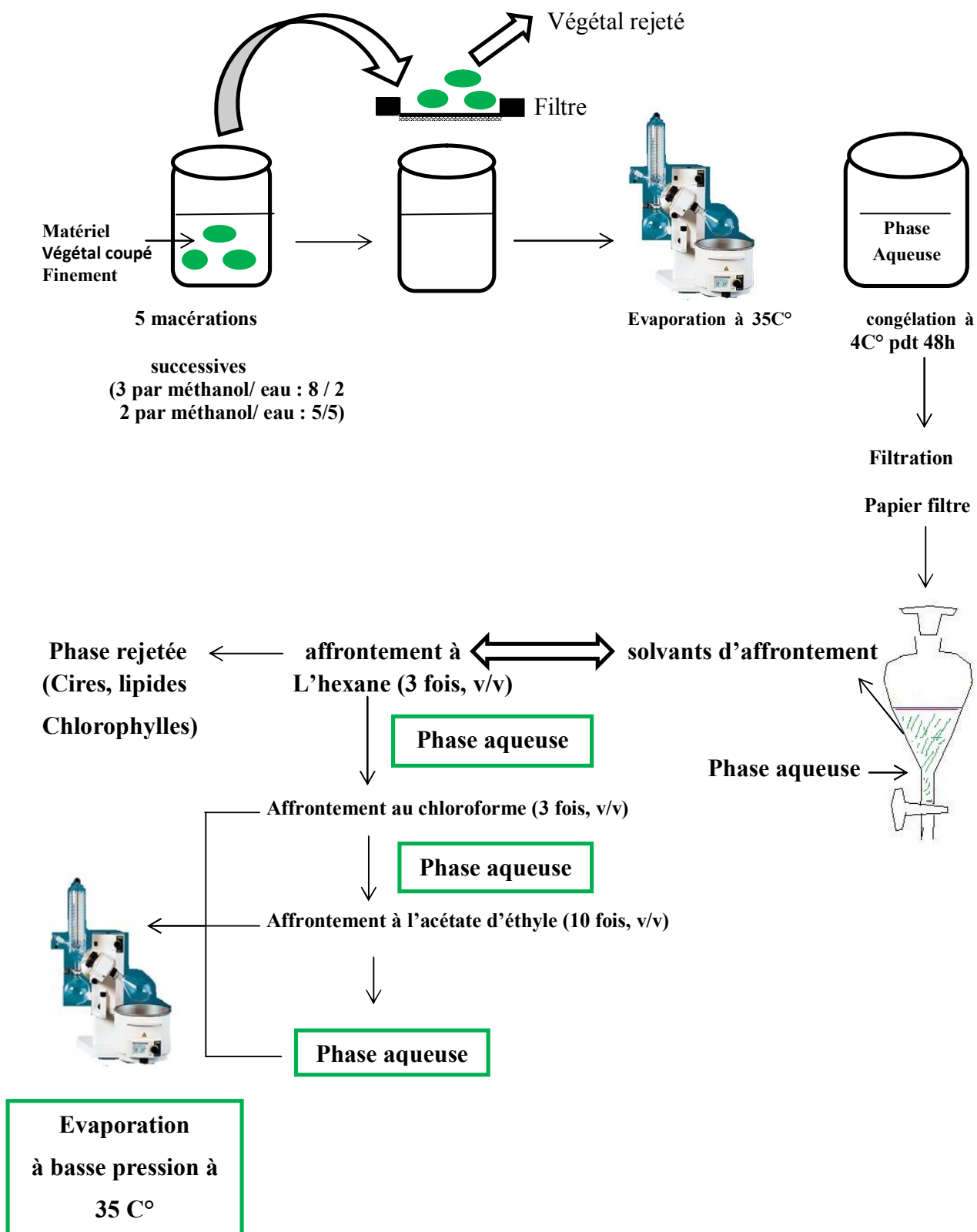


Figure 07 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.

4.4. Analyses des extraits :

4.4.1. Analyse qualitatif :

4.4.1.1. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles [2].

4.4.1.1.1. Principe :

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants. Et une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide [2].

4.4.1.1.2. Protocole :

- **Préparation de la phase stationnaire :**

La plaque CCM de gel de silice est coupée à des petites plaques de taille (6*7cm) et utilisées comme phase stationnaire.

- **Préparation de la phase mobile :**

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations (tableau 04).

Tableau 04 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.

Systèmes solvants	Proportions (v/v)
Chloroforme/méthanol	10/2
Acétate d'éthyle/méthanol/eau	7/1.5/1.5
Dichlorométhane/méthanol	5/1
Acétate d'éthyle/acide formique/eau	8/1/1
Dichlorométhane/acétate d'éthyle	9/1
Toluène/méthanol/éthanol	4/3/3
Méthanol/eau/acide acétique	18/1/1
Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique	50/40/10

Les systèmes solvants choisis sont utilisés comme des éluants des phases stationnaires, leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

- **Dépôts :**

Pour analyser les cinq extraits ; brut (EBr), chloroformique (ECh), d'acétate d'éthyle (EAc), aqueux (EAq) et infusé (Inf) 5 μ l de chaque extrait sont déposés à l'aide d'une micropipette de 10ul d'une façon perpendiculaire et linéaire, les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile.

- **Développement des plaques :**

Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal, on obtient autant de tâches que les constituants sur le trajet de migration du solvant.

- **Révélation :**

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.

Dans notre travail on utilise la révélation aux UV qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

- **Identification des composées phénoliques:**

L'examen des flavonoïdes en lumière ultraviolette est le plus utilisé pour l'identification et la détermination des différents types des flavonoïdes. Tous les flavonoïdes apparaissent en UV sous forme de spots colorés, permettant de donner des renseignements pour déterminer la structure du produit [68]. Le tableau 05 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 05: composés phénoliques identifiés par CCM [48].

Couleurs sous UV	composés probables
Rouge	anthocyanidine 3 glucoside
Rose	anthocyanidine 3,5 di glucoside
Orange	anthocyanidine 3 glucoside
Orange pale	anthocyanidine 3 glucoside
Jaune	flavonols
Jaune pâle	flavonols
Vert	rutine
Bleu sombre	flavonols, flavonones, auronnes
Bleu vif	hydroquinones
Bleu pâle	acide phénol
Bleu blanc fluo	acide phénol
Mauve	flavonols, flavonones, isoflavonones, Flavones.
Violet	flavonols, flavonones, isoflavonones,
Pourpre sombre	flavone, chalcones.

4.4.2. Analyse quantitatif :

4.4.2.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par Wong *et al.*, 2006 [80] modifiée dans notre laboratoire .

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue réduite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel [63, 41].

- **Protocole :**

100 µl d'extrait brute et d'infusé de plante ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables a été mélangé à 200 µl du réactif de Folin (Sigma Aldrich) et 3160 µl d'eau distillé, Après 3 min, 600 µl d'une solution de carbonate de sodium à 20% (p/v) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

Les teneurs en phénols totaux des extraits de plantes sont déterminées graphiquement et exprimées en termes d'équivalent d'acide gallique (biochem) mg/g de matière sèche.

4.4.2.2. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le chlorure d'aluminium selon la méthode citée par Bahorun *et al.*, 1996 [3].

- **Principe :**

Le taux des flavonoïdes est estimé par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance du complexe flavonoïdes-aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm.

- **Protocole :**

1 ml de chaque extrait (les 4 fractions + l'infusé) et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation. La quantité des flavonoïdes est estimée en g équivalent de quercétine par g d'échantillon.

4.5. Les activités biologiques :

4.5.1. L'activité antioxydante (*in vitro*) :

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres [61].

Dans notre travail, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrate) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008) [43] modifié dans notre laboratoire.

- **Principe :**

Les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrate (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

- **Protocole :**

Dans des tubes on introduit 1 ml de chaque extrait (1mg/ml) et 1ml de la solution méthanolique au DPPH (0.004%), après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par le spectrophotomètre.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité Scavenger (\%)} = (\text{A contrôle} - \text{A échant} / \text{A contrôle}) \times 100$$

Où :

A contrôle : Absorbance du contrôle.

A échant : Absorbance des extraits testés.

4.5.2. L'activité antalgique (*in vivo*):

Le protocole a été effectué selon la méthode de (Siegmund et coll. 1957) [69].

4.5.2.1. Choix des animaux :

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats femelles, *Wistar albinos* dont le poids varie entre 128 et 147g, procurés aux prés de l'Institut Pasteur d' Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages avec un porte étiquette où est mentionné le nom du lot. Ces rats sont utilisés après une période d'adaptation plus de 7 jours, ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard. Avant l'expérimentation, les rats ont été mis à jeun pendant 18 heures.

4.5.2.1. Principe :

Vérification de l'action inhibitrice des extraits sur la douleur provoquée chez les rats par l'injection intra-péritonéale (I.P) d'une solution diluée d'acide acétique (Test de torsion).

4.5.2.2. Protocole :

Les animaux ont été répartis au hasard en 04 lots de 4 rats chacun :

- Un lot témoin recevant par voie oral l'eau distillée.
- Un lot recevant par voie oral l'infusé la menthe pouliot à la dose de 100mg/kg, et autre recevant l'infusé à 200 mg/kg.
- Un lot recevant par la même voie une solution de Paracétamol 150 mg/kg.

Une heure après les différents traitements, une injection d'une solution d'acide acétique 1 % a été faite dans le péritoine de chaque rat. Le syndrome douloureux se caractérise par des

mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons compté pour chaque souris le nombre torsions pour les 20 minutes suivantes.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque groupe traité par l'extrait, Paracétamol, et le témoin.

Les résultats sont exprimés sous formes de moyenne (M) des torsions effectuées dans chaque groupe \pm déviation standard (DS).

Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante:

$$\frac{[(\text{Moyenne du nombre de torsions groupe témoin}) - (\text{Moyenne du nombre de torsions groupe traité})]}{(\text{Moyenne du nombre de torsions groupe témoin})} \times 100.$$

*Chapitre V : résultats et
discussion*

Chapitre V : résultats et discussion.

La plante *Mentha pulegium*, qui a été sélectionnée pour ses propriétés biologiques, après l'élimination des racines, la partie aérienne est broyée et stockée dans un endroit sec.

5.1. Tests préliminaires :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait aqueux, méthanolique ou sur la poudre végétale selon le protocole à suivre.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Le Tableau 06, regroupe les résultats des tests chimiques réalisés sur la plante *Mentha pulegium*.

Tableau 06 : Résultats des tests préliminaires de *Mentha pulegium*.

Extrait	Métabolite testé	Couleur résulte	Résultats
Aqueux	Polyphénols	Rouge	++
	Flavonoïdes	rose orangé	++
	Tanins	Bleu noire	+++
	Saponosides	Mousse persistante	++
	Anthocyanes	Rose-rouge	-
Méthanolique	Alcaloïdes	Tache orange sous UV	-
Poudre	coumarine	Fluorescence jaune	-

Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive : ++

Réaction négative : -

La coloration rouge après l'ajout d'HCl confirme la présence des polyphénols. Un virage de couleur en rose orangé après l'ajout de Mg indique la présence des flavonoïdes. Une coloration noire obtenue après l'ajout de FeCl₃ montre la présence des tanins galliques et catéchiques. Une mousse persistante à 5 min après l'agitation due à la présence des

saponosides. Aucun changement de couleur après l'ajout d'ammoniaque, montre l'absence des anthocyanes. Sous UV on n'a pas révélé des taches oranges sur la plaque CCM ni la fluorescence jaune sur le tube ce qui indique l'absence des alcaloïdes et les coumarines.

Au vu de ces résultats, nous déduisons que la plante *Mentha pulegium* de la région M'sila, comme d'autres espèces de la famille Lamiacée, est riche en divers métabolites secondaires, ce qui explique l'intérêt et l'attention portée par les habitants de la région à travers l'usage traditionnelle de cette plante.

5.2. Extraction des principes actifs :

5.2.1. Extraction des polyphénols :

L'extraction a été réalisée par l'extracteur Soxhlet, qui permet de faire l'extraction par solvant continue d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide. Le méthanol peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives.

L'extrait méthanolique (EBr) récupéré après évaporation à sec et sous pression réduite a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les polyphénols totaux. Le rendement a été déterminé par rapport à 20 g de matière végétale sèche ; rendu en poudre ; subissant une extraction douce.

5.2.2. Extraction des flavonoïdes :

L'extraction a été réalisée selon la méthode de (Markham., 1982), qui est très recommandée pour l'extraction des flavonoïdes. Elle s'effectue en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange hydro alcoolique méthanol/eau (80/20 v/v; 50/50 v/v) pour obtenir initialement l'extrait contenant les flavonoïdes totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par une série de solvants à polarité croissante (Hexane → Chloroforme → Acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait hydro alcoolique selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés). De ce fait, 04 différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait d'hexane (rejeté car il contient des graisses et des pigments), l'extrait du chloroforme (ECh), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) et l'extrait aqueux (EAq). Le rendement de ces fractions est exprimé en pourcentage de matière sèche.

5.2.3. Calculs des rendements :

La couleur, l'aspect, la composition ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids de la matière sèche sont représentés dans le **tableau 07** ci-dessous.

Tableau 07 : Caractéristiques et rendements en % des extraits phénoliques obtenus par macération et au Soxhlet à partir de la plante *Mentha pulegium*.

Extrait	compositions	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Extrait brute	Polyphénols totaux	Pâteux	Marron foncé	17.16
Fraction chloroforme	Flavonoïdes aglycones	Pâteux	Marron foncé	1.46
Fraction acétate d'éthyle	Flavonoïdes mono et diglycosidique	poudre	Marron claire	2.22
Extrait aqueux	Flavonoïdes di tri et tétra glycosidiques	Pâteux	Marron foncé	16.8

Les résultats obtenus montrent que parmi les quatre extraits, l'extrait brute représente le rendement le plus élevé 17.16%, suivi par l'extrait aqueux 16,8%, alors que les extraits d'acétate et chloroformique possèdent les rendements les plus bas successivement 2.22 % et 1.46%.

La différence entre le rendement d'extrait brute et le rendement de chloroforme peut être expliqué par la présence de composés lipophiles (acides gras, caroténoïdes, chlorophylles) de poids moléculaire élevé plus soluble dans le premier solvant que dans le second. Les flavonoïdes extraits de menthe pouliot sont beaucoup plus polaires qu'apolaires, ce qui explique le rendement élevés de l'extrait aqueux (16.8%).

Le chloroforme responsable de l'extraction des flavonoïdes aglycones par contre l'acétate est le responsable de l'extraction des flavonoïdes glycolysés, on constate que dans notre plante ces derniers sont plus abondants que les premiers.

Toutefois, ces extractions peuvent être considérées comme complémentaires dans la mesure où les produits naturels présentent des polarités assez différentes. Il s'agira donc de

comparer les compositions respectives en ces produits dans ces extraits en combinant des techniques de séparations et celles permettant l'identification structurale.

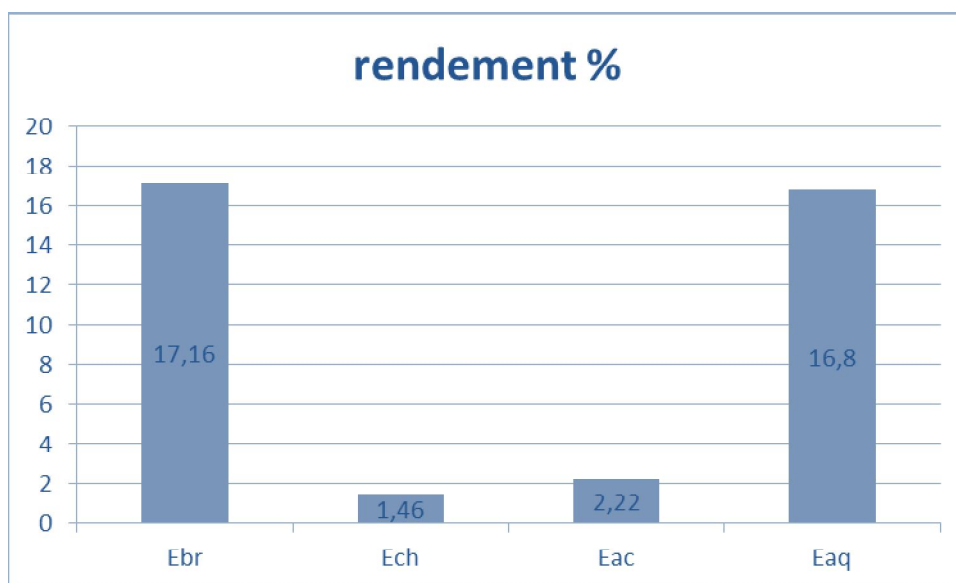


Figure 08 : rendement d'extraction des différents extraits en %.

5.3. Analyses des extraits :

5.3.1. Analyse qualitative :

5.3.1.1. Chromatographie sur couche mince :

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM), puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Une séparation par CCM commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, la dimension de la cuve et le degré de saturation de la chambre de développement par les vapeurs solvants. Tous ces facteurs conditionnent de pré la séparation [81].

Huit systèmes de solvant, de polarités différentes, choisies à partir de la littérature ; les chromatogrammes résultants comportent une série de spots. L'identification des composés est basée sur la comparaison des couleurs observées, sous lampe UV, avec ceux dans le tableau de Markham, 1982 (Tableau 08).

La CCM n'est pas suffisante à elle seule, pour identifier d'une manière précise un produit, mais apporte des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structure.

S5 MEA (18/1/1)	4 taches sombres (une plus grande et d'autres moyennes) une tache claire	S1	marron bleu jaune	/ Ac phénol flavonols flavones anthocyanidine-3-glycoside flavonols, flavonones, et aurones
		S2	bleu marron	
		S3	marron claire	
		S4	violet claire marron rouge	
		S5	marron Vert	
S6 CAA (50/40/10)	6 taches sombres (taille moyenne) 14 taches claires	S1	bleu marron jaune	Ac phénol / Flavonols Flavonols, flavonones et aurones Anthocyanidine-3-glycoside
		S2	bleu marron	
		S3	vert claire	
		S4	rouge bleu	
		S5	vert claire bleu Vert claire Marron	
S7 DM (5/1)	4 taches sombres (taille moyenne) 3 taches claires	S1	marron jaune bleu	/ Flavonols Ac phénol Anthocyanidine-3-glycosides
		S2	mauve bleu marron	
		S3	/	
		S4	rouge bleu marron	
		S5	bleu	
S8 DA (18/2)	4 taches sombres Une tache moins claire	S1	marron	/ Flavonols Ac phénol
		S2	jaune jaune pale	
		S3	/	
		S4	bleu	
		S5	jaune	

Les résultats représentés dans le tableau 09, montrent que le système qui a donné la meilleure séparation est celui de Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (50/40/40 v/v/v), ce dernier permis de séparer 20 taches ce qui explique la solubilité différentielle des composés phénoliques dans ce système.

- **Observation sous UV à 254 nm :**

Le système 6 a permis de séparer 20 taches (6 sombres et 14 moins claires) de taille moyenne et de forme plus ou moins circulaire. Le système 3 a séparé 14 taches (6 taches sombres et 8 taches claires) d'une taille moyenne et d'une forme ovale.

Le système 4 a permis de séparer 13 taches (6 taches sombres et 7 moins claires) d'une taille plus ou moins grande et d'une forme plus ou moins circulaire. Les systèmes 2 et 7 ont permis de séparer 7 taches plus ou moins sombre et de taille plus ou moins moyenne, alors que les systèmes 1, 5 et 8 n'ont permis que la séparation de 5 taches.

- **Observation sous UV à 366 nm :**

Les huit systèmes solvants ont montré la présence de différentes classes de composés phénoliques dans les extraits testés ce qui explique l'apparition des taches de différentes couleurs.

Les systèmes 1, 2, 3 et 6 ont séparé principalement les flavonols, flavones, isoflavones et flavanones, ce qui confirme que le méthanol et l'acétate d'éthyle sont les responsables de leurs éluions, tandis que les systèmes 6 et 7 ont séparé principalement les acides phénoliques, par contre le système 4 a séparé les pigments ce qui est montré par la présence de 6 taches marrons.

Le système 5 a présenté des taches marron et bleues qui ont le même rapport frontal, dans les cinq extraits, ce qui montre la présence des pigments et des acides phénoliques.

Le système 6 a présenté des taches bleues, ont le même Rf, dans l'extrait d'acétate, brute et infusé, avec une coloration plus ou moins intense ce qui confirme la présence des acides phénoliques, ce résultat a été confirmé par le système 7 et 8.

L'apparition d'une tache rouge dans l'extrait brute, par l'utilisation des différents systèmes solvants, a montré que cet extrait contient l'anthocyanidine- 3- glucoside. Seuls les systèmes 3, 5 et 7 ont permis de séparer les composés de l'extrait aqueux avec une intensité de couleur moins faible que les autres extraits, montrent que cet extrait est moins riche en composés phénoliques.

A travers ces résultats on peut constater que nos extraits contiennent différentes classes phénoliques plus ou moins élevées d'un extrait à l'autre, mais ça reste insuffisante sur le plan quantitatif, ce qui nous a conduit à utiliser des méthodes de dosage qui permettent d'éclairer d'avantage l'image sur la composition de nos extraits.

Tableau 09: résultats de CCM des 3 meilleurs systèmes solvants.

Systèmes solvants	Observation à l'œil	Observation sous UV	
		A 254 nm	A 366 nm
S6 : CAA (50/40/40)			
S3 : AAE (8/1/1)			
S4 : CAA (50/40/10)			

5.3.2. Analyse quantitative :

5.3.2.1. Dosage des polyphénols :

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique de (Wong *et al.*, 2006) modifiée dans notre laboratoire avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g), pour calculer les teneurs en polyphénols totaux on utilise l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique avec une corrélation linéaire $R^2=0.9935$ (Annexe 01).

Les résultats sont représentés dans le tableau 10 et dans la figure 08.

Tableau 10 : Dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de *Mentha pulegium*.

Extraits	Polyphénols totaux ^a
Extrait brute	180,09 ± 12,12
fraction chloroforme	145,81 ± 18,86
Fraction acétate	224,38 ± 15,48
Fraction aqueuse	49,14 ± 6,06
Infusé	29,53 ± 3,57

^a : mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique contient 180,09 ± 12,12 mg EAG/g d'extrait ce résultat est plus élevé que celui de Stagos *et al.*, (2012) : qui a rapporté une valeur de 138 mg EAG/g d'extrait. Cependant, l'extrait du chloroforme contient 145,81 ± 18,86 mg EAG/g d'extrait, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle qui forme la fraction phénolique la mieux représentée (224,38 ± 15,48 mg EAG/g d'extrait), tandis que l'extrait aqueux renferme 49,14 ± 6,06 mg EAG/g d'extrait, alors que l'infusé ne contient que (29,53 ± 3,57 mg EAG/g d'extrait). Cette dernière reste inférieure par rapport à la valeur rapportée par Stagos *et al.*, (2012) qui rapporte une valeur de 188 mg EAG/g d'extrait.

Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques [20]. La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes :

- c'est une méthode qui répond aux critères de faisabilité et de reproductibilité.
- la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée.
- la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré.
- c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche sur les antioxydants alimentaires à travers le monde [31].

Le réactif de Folin n'est pas spécifique aux polyphénols car il réagit avec les acides aminés, tyrosines et tryptophane des protéines. De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés aromatiques sont en proportion trop faible par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits [7]. L'étude statistique a montré qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) entre les différents extraits sauf entre les extraits suivants : ECh- EBr ; EAc- EBr et inf-EAq (figure 08).

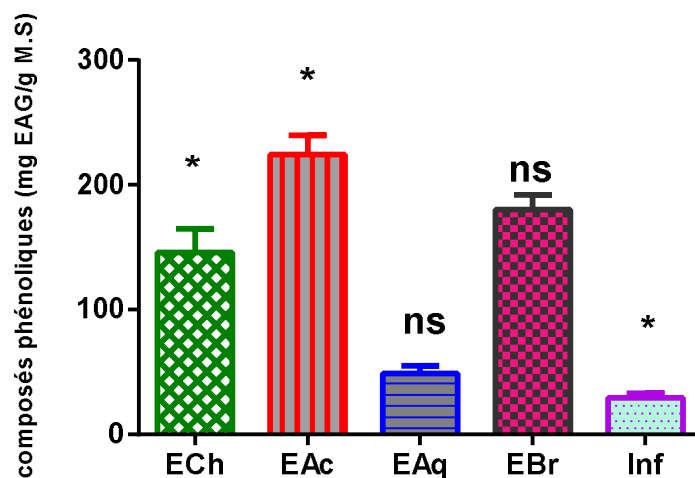


Figure 09 : Teneurs en composés phénoliques des extraits de menthe pouliot.

ns : indique l'absence de différence significative ($p < 0.05$).
 L'étoile indique la présence de différence significative ($p < 0.05$).
 Les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=2).
 M.S : matière sèche.

5.3.2.2. Dosage des flavonoïdes :

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits [23]. Actuellement plusieurs recherches sont réalisées sur le rôle antioxydant de ces substances.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique de (Bahorun et *al.*, 1996). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme de la matière végétale sèche (mg EQ/g), pour calculer les teneurs en flavonoïdes totaux on a utilisé l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de quercétine avec une corrélation linéaire $R^2=0.9997$ (Annexe 02).

Les résultats sont représentés dans le tableau 11 et dans la figure 09.

Tableau 11 : Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de Menthe pouliot

Extraits	flavonoïdes totaux ^b
Extrait brute	29,7± 0,424
Fraction chloroforme	41,574 ± 0,22
Fraction acétate	51,476± 1,80
Fraction aqueuse	19,409± 0,05
Infusé	2,099 ± 0,023

^b: mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait, les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Les résultats apparents dans le tableau montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de chloroforme sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de (51,47 ± 1,80 mg EQ/g d'extrait) et (41,57 ± 0,22 mg EQ/g d'extrait) respectivement. Par la suite vient l'extrait brut (29,7 ± 0,42 mg EQ/mg d'extrait) suivi par l'extrait aqueux (19,40 ± 0,05 mg EQ/mg d'extrait). Par contre l'infusé contient seulement (2,09 ± 0,02 mg EQ/mg d'extrait).

L'étude statistique montre qu'il y a une très bonne différence significative entre les extraits dosés ($p<0,05$), les résultats sont représentés dans la figure 10.

A travers ces résultats on peut déduire que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes varie selon le solvant, le temps et la méthode d'extraction.

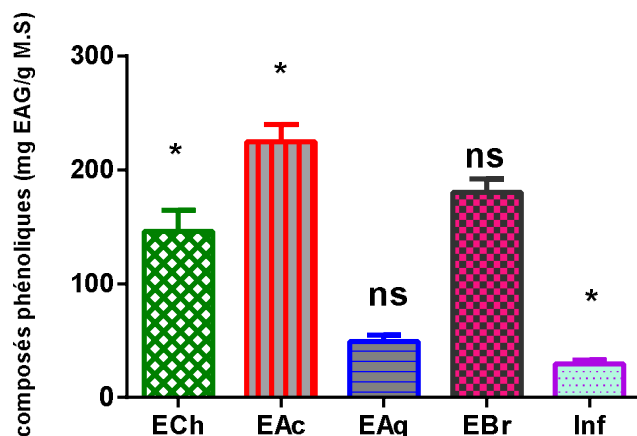


Figure 10 : Teneurs en Flavonoïdes des extraits de menthe pouliot.

L'étoile montre la présence de différence significative ($p < 0.05$).
Les barres verticales indiquent les écarts types (nombre d'essais=2).
M.S ; matière sèche.

L'étude de corrélation linéaire entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes a montré qu'il y avait une bonne corrélation entre les deux ($r^2 = 0,81$) (annexe 03), ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols.

5.4. Les activités biologiques :

5.4.1. L'activité antioxydante (*in vitro*) :

L'activité antioxydante des différents extraits de *Mentha pulegium* a été étudiée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz et al., 2008) modifiée dans notre laboratoire. C'est une méthode spectrophotométrique basée sur la détermination du pourcentage de réduction de DPPH qui s'accompagne d'un changement de la couleur du violet vers le jaune. Cette décoloration est due à la présence d'un antioxydant, la cause dépend de la capacité de ce dernier de donner un hydrogène et donc de stabiliser ce radical (figure 10).

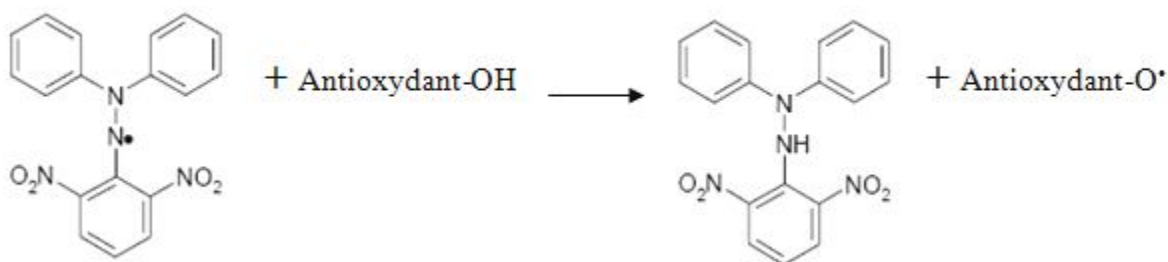


Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [16].

Un test préliminaire se fait, montre que tous nos extraits ont des activités antioxydantes. Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité anti radicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC50, qui est défini comme la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH 16.

Dans notre travail on a utilisé le paramètre IC50 pour déterminer le pouvoir antioxydant de nos extraits, on utilise l'acide ascorbique comme référence puisque il est connu par son activité antioxydante la plus élevée. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : IC50 des différents extraits de *Mentha pulegium*.

Les extraits	IC50 µg/ml
Extrait brute	24 ± 5,65
Extrait chloroformique	60 ± 1,42
Extrait d'acétate	42 ± 2,82
Extrait aqueux	22 ± 2,82
Acide ascorbique	1,7 ± 0,28

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Le standard utilisé (acide ascorbique) montre un pouvoir antioxydant élevé avec une valeur d'IC50 de (1,7 ± 0,283). Parmi les quatre extraits de notre plante, les extraits polaires (aqueux et méthanolique) ont les activités antioxydantes les plus élevés des IC50 de (22±2,82 et 24±5,65) respectivement, suivi par l'extrait d'acétate avec une IC50 de (42 ± 2,82), par contre l'extrait chloroformique représente l'extrait avec le pouvoir antioxydant le plus bas IC50 de (60±1.42).

Le travail de Djemai-Z A, 2009 montre que l'acide ascorbique a une bonne activité antioxydante vis-à-vis du DPPH (1.44±0.07), ce résultat est en accord total avec le résultat de notre travail.

Les résultats de l'extrait brute et l'extrait aqueux montrent une activité antioxydante inférieure par rapport à celle de kamkar et all, 2010 (5,5 ± 0.3 ; 6,1 ± 0,1). Cette différence pourrait s'expliquer par la différence entre les méthodes d'extractions et de la différence entre l'origine de la plante (lieu et date de récolte et mode de séchage... etc).

Mais quand on a comparé le pouvoir radicalaire de nos extraits avec celle de l'huile essentiel selon les travaux de kamkar et all, 2010, on remarque que ce dernier a une activité antioxydante plus bas (14736 ± 156), car les polyphénols généralement et les flavonoïdes exceptionnellement sont les métabolites secondaires qui représentent les antioxydants les plus fortes.

On constate d'après ces résultats et d'après la première partie de notre travail (étude phytochimique : CCM, dosage) que les extraits polaires ont les activités antioxydantes les plus élevées.

Une étude statistique a été réalisé, utilisant l'acide ascorbique comme référence, a montré qu'il y a une déférence significative entre l'acide ascorbique et les 4 extraits de la plantes ($p < 0.05$). Cette dernière est représentée dans la figure si dessous.

Une faible corrélation a été observée entre le potentiel antioxydant et les teneurs en polyphénols totaux ($r^2 = 0,488$), et en flavonoïdes ($r^2 = 0,519$) (annexe 04 et 05).

A travers ces résultats on peut constater que la concentration élevée des polyphénols et des flavonoïdes peut directement affecter le potentiel antioxydant, puisque ils réagissent en compétition avec le piégeage de DPPH, ce qui bloque la réaction et diminue le nombre de DPPH stabilisé, sans oublier qu'il y a une multitude de facteurs qui peuvent agir et influent sur l'activité antioxydante tels que le nombre et la position des groupements hydroxyles, le caractère hydrophobe ou hydrophile des antioxydants (polaire, et apolaire).

5.4.2. L'activité analgésique :

L'activité analgésique de l'infusé de menthe pouliot a été effectué selon la méthode de (Siegmund et coll. 1957). La méthode est basée sur le calcul des pourcentages d'inhibitions des torsions causés par une substance irritante qui est l'acide acétique, 4 lots de rats *Wistar albinos* ont été le sujet de différents traitements, chaque lot contient 4 rats, un lot reçoit l'eau distillée considéré comme témoin, deux autres reçoivent la plante avec les doses 100m/kg et 200mg/kg respectivement et le dernier reçoit le paracétamol comme analgésique de référence. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 13 : Activités analgésiques de paracétamol et de l'infusé de menthe pouliot.

traitements	dose	nombre de torsions	pourcentage d'inhibition %
Eau distillé	/	85±17,74	/
Paracétamol	150 mg/kg	50,5± 6,85	40,59
Infusé	100 mg/kg	24,5 ±9,88	71,18
Infusé	200mg/kg	41±6,98	51,76

L'injection de l'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale provoque une moyenne de 85 crampes sur une durée de temps de 30 min. Le paracétamol inhibe ces crampes avec un pourcentage de 40,59%, tandis que l'infusé (100 mg/kg) a un pourcentage d'inhibition 71,18%, par contre l'infusé (200 mg/kg) inhibe leur production avec un pourcentage de 51,76%.

Les résultats montrent que les différents traitements ont des effets analgésiques statistiquement significatifs par rapport au témoin ($p < 0.05$). L'effet analgésique de la dose 100mg/kg de la plante est plus important que celui de paracétamol. Alors que la dose 200mg/kg ne donnent aucun effet significatif comparativement à notre standard (figure 12).

L'étude phytochimique a mis en évidence la présence de métabolites secondaires à savoir des polyphénols et des flavonoïdes et la CCM a montré également que l'infusé en les contient, ce qui nous conduit à suggérer que ces derniers sont les responsables majeurs de l'effet analgésique.

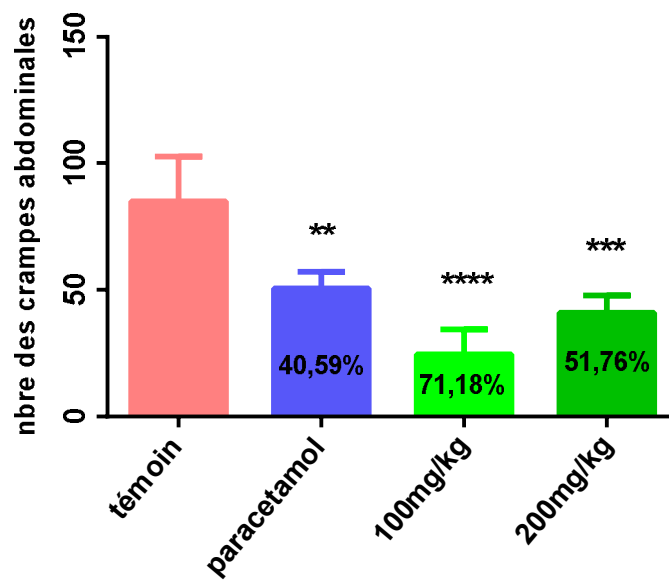


Figure 12 : Effet analgésique de paracétamol et de Menthe pouliot 100-200mg/kg.

Les comparaisons sont effectuées par rapport le témoin ; ** : $p < 0.01$, **** différence très significative.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans les pays du monde entier, le développement de la médecine reste encore limité, la pauvreté, le manque des moyens, les traditions obligent les populations de s'orienter vers la médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales.

A l'époque actuelle ces plantes sont le sujet de plusieurs recherches à cause de leurs richesses en métabolites secondaires, ces derniers sont connus par leurs effets thérapeutiques.

Notre étude a été réalisée pour l'évaluation des propriétés antioxydante et analgésique d'une plante très connu en Algérie, c'est la menthe pouliot.

Les tests préliminaires ont montré la présence de certains métabolites secondaires.

Les extractions ont montré des rendements moyens en polyphénols et en flavonoïdes.

L'analyse qualitative réalisée par CCM a montré la présence des différents composés phénoliques. Quantitativement deux méthodes sont utilisés pour la détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux : la première de Folin Ciocalteu a montré des quantités moyennement importante, la deuxième d'AlCl₃ nous a mené à conclure que la plante contient principalement des flavonoïdes.

Le pouvoir antioxydant des polyphénols et des flavonoïdes dans les différents extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que les flavonoïdes polaire possèdent une bonne activité, alors ces substances sont considérées comme des agents antioxydants qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Au cours de cette étude l'évaluation de l'activité analgésique a été testé sur des rats Wistar albinos, les résultats montrent que l'infusé de menthe pouliot a un bon effet analgésique à cause de son contenu riche en flavonoïdes.

En fin, ces résultats ne représentent qu'une première étape dans la recherche sur les principes actifs des métabolites secondaires de *Mentha Pulegium* L, plusieurs études pourraient être réalisé sur cette plante afin d'identifier précisément les composés responsables de ses différentes activités.

L'Algérie est connue par sa biodiversité, des centaines de plantes aromatiques et médicinales existent sur ces différentes régions, l'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de plusieurs maladies reviennent au premier plan.

Une stratégie de développement du secteur, recherche sur les plantes médicinales, doit être élaborer afin de mieux valoriser nos ressources naturelles en plantes médicinales et d'élargir leurs utilisation dans les différent secteurs économique et au développent durable.

De cet effet et comme perspective de notre travail on suggère de :

- Donner l'importance aux travaux de recherche scientifique réalisés pour les différents buts (mémoires de fin d'étude... etc) et appliquer les résultats pour trouver des solutions réelles aux problèmes de la santé publique.
- Développer des médicaments anti radicalaire et analgésique à base des plantes médicinales qui ont prouvé un pouvoir antioxydant et analgésique à travers la consolidation et le renforcement des connaissances sur les plantes médicinales et leur utilisation par la mise en œuvre des programmes de recherche-développement.
- Promouvoir les produits à base de plantes médicinales sur le marché national et international à travers la réalisation d'études de marché, la mise en place d'un système de veille commerciale et concurrentielle et la réalisation de stratégie marketing et de communication sur les produits.
- Réglementer et encourager le secteur plantes à utilisation médicale à travers la mise en œuvre d'appui financier aux initiatives locales, la mise en place d'un cadre incitatif pour les professionnels de cette filière.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

[1] Aissat S. (2010) : Mesure de l'impact toxique du paracétamol à doses thérapeutiques chez 11 alcooliques adultes volontaires à travers le dosage des taux de quelques marqueurs hépatiques, et évaluation du danger encouru par deux présumés intoxiqués par ce médicament. Mémoire DES en biochimie.

[2] Akroum S. (2006) : Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba* L. mémoire de magistère.

[3] Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Yesseur J., Cazin J.C et Pinkas M. (1996) : Oxygen species activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46(11): 1086-1089.

[4] Belkheiri N. (2010) : Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de doctorat, spécialité : chimie-biologie-santé, 193.

[5] Beloued A. (2009) : plantes médicinales d'Algérie. 5ème édition, 255.

[6] Blamey M., Grey W.C. (2009) : Toutes les fleurs de Méditerranée: Les fleurs, les graminées, les arbres et les arbustes. Delachaux et Niestlé, 560.

[7] Boizot N., Charpentier J.P. (2006) : Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.

[8] Boullard B. (2001) : plante médicinale du monde réalités et croyances. Editions Estem, Paris.

[9] Boumaza A. (2009) : Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* Coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Mémoire de magistère, 125.

[10] Bruneton J. (1999) : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd, Lavoisier, Paris, 1120.

[11] Bruneton J. (2008) : plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Editions Lavoisier. 3ème édition, 1120.

[12] Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R. (1971) : Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).

- [13] Dellille L. (2007) : les plantes médicinales d'algérie. Berti editions, Alger, 240.
- [14] Deyson G. (1979) : organisation et classification des plantes vasculaires. CDU et SEDES réunis, 540.
- [15] Djemai-Z S. (2009): Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. mémoire de magistère, 56.
- [16] Dohou N., Yamini K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A et Gmira N. (2003): screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. Bull. Soc. Pharm, Bordeaux, 142 : 61-78.
- [17] Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M. (2008): Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine, Gvozdjakova A (ed), 19-43.
- [18] Elizabeth M., Okpako D., Evans F.J. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Pharmacological methods in phytotherapy research . Ed Wiley, Engand; 131-154.
- [19] Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. Jurgens G. (1992): The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13: 341-390.
- [20] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008) : Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities . *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- [21] Favier A. (2003) : Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- [22] Fournier P. (1999) : plante médicinale. Connaissance et mémoires européennes, 3 tomes, Paris, 636.
- [23] Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez A. (2006): Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220- 1234.
- [24] Guignard J-L. (1998) : Abrégé botanique. 2ème Edition Masson, Paris.278.

- [25] Guignard J-L. (2001) : Botanique systématique moléculaire. Masson, Paris, 290.
- [26] Hale A. L. (2003): Screening Potato Genotypes for antioxydant activity, identification of the responsables compounds and differentiating russet norkotah strains using aflp and microsatellite marker analysis. Office of graduate studies of Texas A&M University. Genetics, 260.
- [27] Hamadi N. (2010) : Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Mémoire de magistère, 58.
- [28] Hammoudi R. (2009) : Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante *Teucrium polium geyrii* provenant de la région Tamanrasset. Mémoire de magistère.
- [29] Harman D. (2000): Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*; 928:1–21.
- [30] Hmiri S., Rahouti M., Habib Z., Satrani B., Ghanmi M et El Ajjouri M. (2011) : evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Maroc*, 80 :824-836.
- [31] Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005): The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 53:1841-1856.
- [32] Igor P.L.B. (2003) : Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (Rutaceae). Thèse, pharmacie ,Bamako, Mali, 128.
- [33] Jadot G. (1994) : Antioxydant et vieillissement. Jhon Libbey Eurotext, Paris, 34.
- [34] Kamkara A., Javana A.J., Asadib F., Kamalinejad M. (2010): The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7):1796–1800.
- [35] Kehrer J.P. (1993): Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Critical review in toxicology*, 23 (1): 21-48.
- [36] Koudougou K. (2000): Etude de la chimie et de l'activité anti-mycosique des extraits de *Biophytum petersianum* KLOTZSCH (Oxalidaceae). Mémoire de DEA.

- [37] Koumab S. (2003) : Utilisation des antalgiques ou analgésiques dans le Service de Chirurgie orthopédique et Traumatologique de l'Hôpital Gabriel Touré. Thèse, pharmacie, Bamako, Mali, 79.
- [38] Lahsissene H., Kahoudja A., Tijane M et Hseini S. (2009) : Catalogue des plantes médicinales utilisés dans la région de Zaer (Maroc occidental). le jeunia, Liège (Belgique), 24. BE ISSN 0457-4184.
- [39] Laight D.W., Carrier M.J., Anggards E.E. (2000) : Antioxidants, diabetes and endothelial function. *cardiovasc Res*, 47: 457-464.
- [40] Lambinon J., Delvosalle L., Duvigneaud J. (2004) : La nouvelle flore de la Belgique du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisins. 5eme édition, Jardin Botanique National de Belgique, 1167.
- [41] Lapronik B., Prosek M., Golc-Wondra A. (2005): comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and tim extraction. *Journal of Food Engineering*, 71:214-222.
- [42] Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S.Mc., Cord JM. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108: 652-659.
- [43] Lopes-Lutz D., Alviano, D., Alviano C., Kolodziejczyk P. (2008): Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.
- [44] Mabile L., Meilhac O., Escargueil-Blanc I., Troly, M., Pieraggi, M.T., Salvayre, R., Nègre-Salvayre A. (1997) : *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 17 :1575-1582.
- [45] Macheix J.J., Fleuriet A., Jay Allemand C. (2005). les composés phénoliques des végétaux ISBN2 -88074-625-6.
- [46] Maged Y. (1999): Free Radicals and Reactive Oxygen Species. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Academic Press, 111-117.
- [47] Maïga, M. S. (1989) : Les analgésiques non morphiniques et leurs inconvénients: Consommation au Mali. Thèse, pharmacie, Bamako, Mali, 79.

- [48] Markham K.R. (1982): techniques of flavonoid identification. Academic press, london, 133.
- [49] Martínez-Cayuella M. (1995): Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77: 147-161.
- [50] Maydani Ma. (2000): effect of functional food ingredient: vit E modulation of cardiovascular disases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr*, 71: 1665-1668.
- [51] Meziti A. (2009) : Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude in vitro et in vivo .Mémoire de magistère, 71.
- [52] Möll F., Beutler M. (2004) : Analgésiques OTC. *Journal suisse de pharmacie*, 476- 482.
- [53] N'guessan K., Kadja B., Zirihi G N., Traoré D et Aké-assi L. (2009) : Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature, Côte-d'Ivoire*, 6 :1-15.
- [54] Nabti A., Cheddani R. (2009) : étude comparative de l'activité antioxydante de la menthe pouliot « *Mentha pulegium* L. » récoltée de différentes régions. Mémoire d'ingénieur d'état en sciences alimentaires.
- [55] Nkhili E. (2009) : Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat, spécialité : Sciences des Aliments, 309.
- [56] Nzengue Y. (2008) : Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de doctorat, 247.
- [57] Pal Yu B. (1994): Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*, 74: 139-155.
- [58] Pascale S-M., Véronique C. (2006): Les polyphénols en agroalimentaire. Tec & Doc lavoisier, Paris, « sciences & Techniques agroalimentaires », 398.
- [59] PASTRE J. O. C. (2005) : Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat.
- [60] Pincemail J., Meurisse., Limet R., Defraigne J.O. (1998) : Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *MS*, 73.

- [61] Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009): Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 :25-39. ISSN 1313-8871.
- [62] Quezel P., Santa S. (1962-1963) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre national de la recherche scientifique, 2 tomes, Paris. 1170.
- [63] Ribéreau-Gayon P. (1968): Notions générales sur les composés phénoliques. IN : les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod : 1-27.
- [64] Rizk A.M. (1982): Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52 (2): 35-42.
- [65] Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44: 215–223.
- [66] Salunkhe D.K. (1990): Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.
- [67] Serafini M., Laranjinha J.A., Almeida L.M., Maiani G. (2000) : Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem*, 11:585-590.
- [68] Shahidi F., Wanasundara P. K. J. P. D. (1992): Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 32 (1):67.
- [69] Siegmund E., Cadmus R et Lu G. (1957) : A method for evaluating both nonnarcotic and narcotic analgesics. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 95: 729-731.
- [70] Sijelmassi A. (1993) : Les plantes médicinales du Maroc. 3ème édition, Fennec, Casablanca, 285.
- [71] Sorg O. (2004): Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662.
- [72] Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsa A.M., Kouretasa D. (2012): Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11):4115–4124

[73] Stief TW. (2003): The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth*; 60:567–572.

[74] Sutour S. (2010) : étude de la composition chimique d'huile essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de doctorat, spécialité : Chimie Organique et Analytique.

[75] Sylla A. (2009) : Etude de la prescription des analgésiques non morphiniques dans l'unité de traumatologie de l'infermerie hopital de kati. Thèse, pharmacie, Bamako, Mali, 89.

[76] Ursini F., Tubaro F., Rong J., Sevanian A. (1999): Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrition reviews*: 57(8): 241-249.

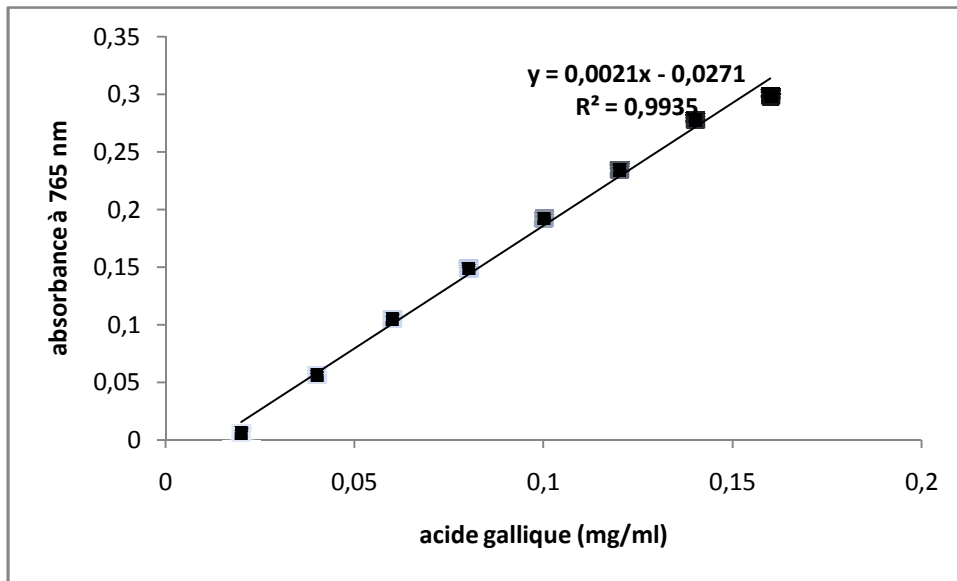
[77] Vansant G. (2004): radicaux libres et antioxydants principes de bases. Symposium « antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

[78] Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. (2004): The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*, 10: 1677-1694.

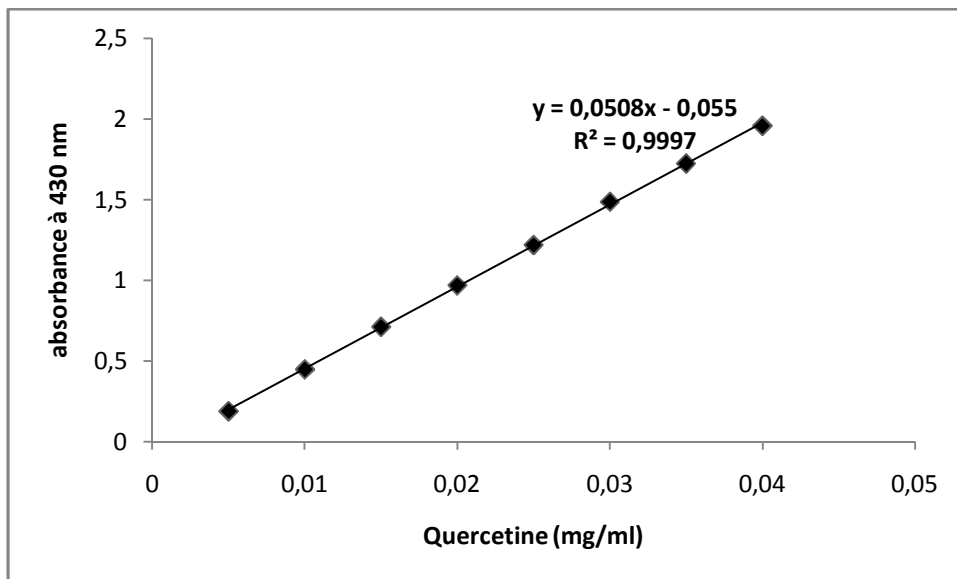
[79] Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G. (2004): Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten*, 44: 381-386.

[80] Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen F. (2006): A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem*, 97: 705-711.

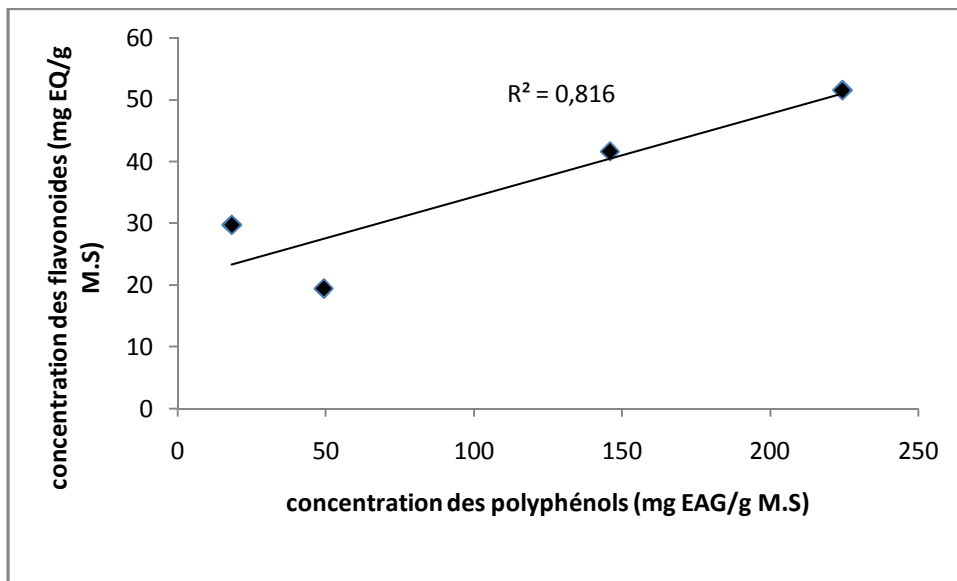
[81] Yrjonen T. (2004): Extraction and planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural products. Conference Room 513 at Viikki Info centre (Viikkinkaari 11), Faculty of pharmacy of the University of Helsenki, 64.



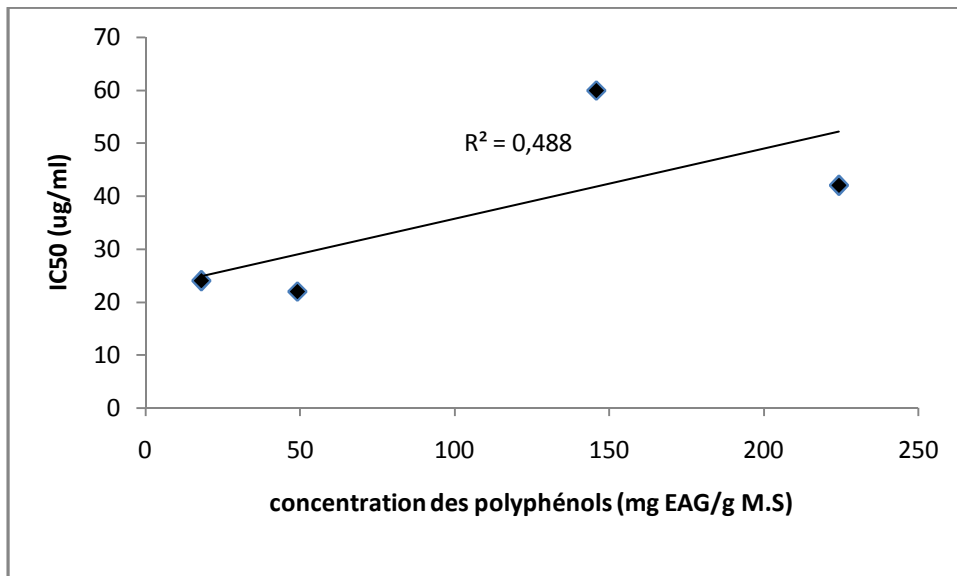
Annexe 01 : Courbe 'étalonnage d'acide gallique.



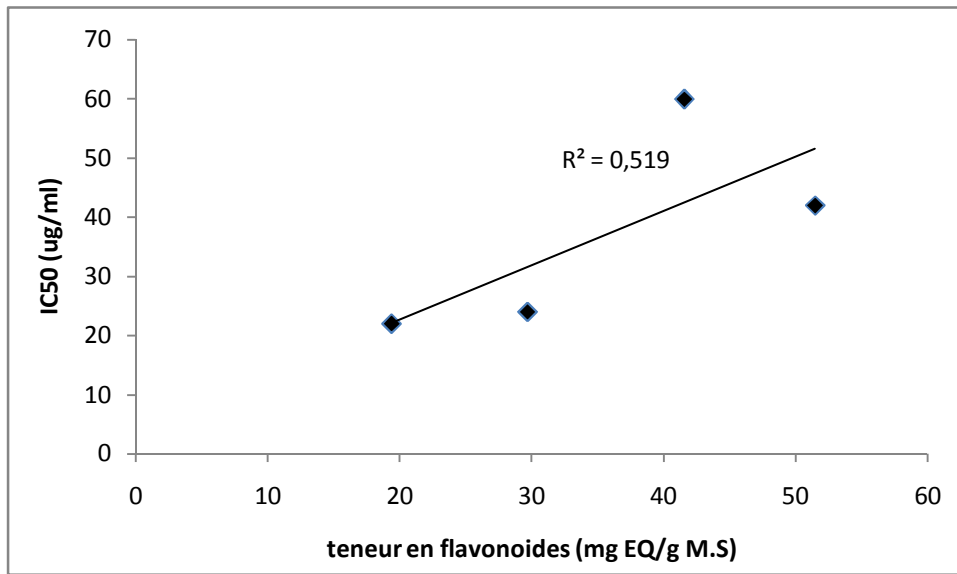
Annexe 02 : courbe d'étalonnage de Quercetine.



Annexe 03 : corrélation entre la teneur en polyphénols et flavonoïdes.



Annexe 04 : corrélation entre la teneur en polyphénols et IC50.



Annexe 05 : corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'IC50.

Résumé :

Le présent travail a pour l'objectif d'effectuer une étude phytochimique et d'évaluer l'activité antioxydante et analgésique de la plante *Mentha pulegium* L.

Une série des tests préliminaire a été montré la présence des différents métabolites secondaires. L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes a été réalisé par deux méthodes à savoir : Soxhlet et Markham. Les résultats obtenus ont montré que parmi les quatre extraits, l'EBr représente le rendement le plus élevé 17.16%.

L'analyse e ces extraits par CCM a révélé la richesse des extraits EBr et EAc en composés phénoliques, ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu, ou les teneurs sont respectivement $180,09 \pm 12,12$ et $244,38 \pm 15,48$ mg EAG/g M.S. par contre le dosage des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ a montré que les extraits ECh et EAc ont les teneurs les plus élevées respectivement $41,57 \pm 1,8$ mg EQ/g M.S.

L'évaluation d'activité antioxydante par la méthode de DPPH a montré que les extraits polaires EBr et EAq sont les plus actifs comme des piègeurs des radicaux libres ou les IC₅₀ sont respectivement $24 \pm 5,65$ et $22 \pm 2,82$.

L'activité analgésique a été testé sur des rats Wistar albinos, les résultats ont montré que la dose 100 mg/kg de la plante a un effet analgésique plus important que celui de paracétamol statistiquement significatif avec un pourcentage d'inhibition 71,18%.

Mots clés : Plantes médicinales, *Mentha pulegium* L., activités biologiques, flavonoïdes, polyphénols.

Abstract:

This work has the objective to perform a phytochemical study and evaluate the antioxidant and analgesic activity of the plant *Mentha pulegium* L.

A series of preliminary tests was shown the presence of various secondary metabolites. The extraction of polyphenols and flavonoids was achieved by two methods namely Soxhlet and Markham. The results showed that among the four extracts, the EBr represents the highest 17.16% yield.

The analysis of these extracts e TLC revealed the wealth of extracts EBr EAc and phenolic compounds, which confirms the results of the determination of polyphenols by the Folin-Ciocalteu or levels are respectively 180.09 ± 12.12 and 244.38 ± 15.48 mg EAG / g against MS by the determination of flavonoids by the AlCl₃ method showed that extracts ECh EAc and have the highest levels respectively 41.57 ± 1.8 mg EQ /MS.

Evaluation of antioxidant activity by DPPH method showed that polar extracts EBr and QAR are most active as free radical scavengers or IC₅₀ are respectively 24 and $22 \pm 5.65 \pm 2.82$. The analgesic activity was tested on Wistar albino rats, the results showed that the dose 100 mg / kg of the plant has a greater than paracetamol statistically significant analgesic effect with a percentage of inhibition 71.18%

Keywords: Medicinal plants, *Mentha pulegium* L., biological activities, flavonoids, polyphenols.

المخلص:

إن الهدف من هذه الدراسة هو التحليل الفيتو كيميائي وتقييم النشاط المضاد للتأكسد والنشاط المسكن لنبتة النعناع البري.

مجموعة من التفاعلات الأولية أثبتت إحتواء النبتة على العديد من المركبات الثانوية، وقد تحقق إستخراج مادة متعددة الفينول والفلافونويدات بواسطة طريقتي سوكسلي وماركهام، حيث تبيننت النتائج أن المستخلص الخام مثل أعلى نسبة 17,18%.

أظهرت نتائج الكروماتوغرافيا إحتواء المستخلص الخام والمستخلص المائي على كمية معتبرة من متعددة الفينول، وهذا ما أكدته نتائج التقدير الكمي ($180,09 \pm 12,12$ و $224,38 \pm 15,48$ مكافئ حمض الغاليك/غ المادة الأولية) على التوالي، أما نتائج التقدير الكمي للفلافونويدات أثبتت أن المستخلصين الكلوروفورمي والأسيتاتي مثلاً أعلى نسبة ($41,57 \pm 1,8$ و $51,47 \pm 1,8$ مع مكافئ الكارستين/ غ المادة الأولية) على التوالي.

نتائج النشاط المضاد للتأكسد بواسطة طريقة جذر DPPH أكدت أن المستخلصين الأكثر نشاطاً هما المستخلصين الأكثر قطبية الخام والمائي حيث أن قيم IC₅₀ هما على التوالي $24 \pm 5,65$ و $22 \pm 2,82$.

نتائج النشاط المسكن التي أجريت على جردان من نوع Wistar albinos أثبتت أن الجرعة التي تملك تأثير مسكن أحسن من الباراسيتامول ذات دلالة إحصائية هي 100 مغ/كغ والتي تملك القدرة على تثبيط الألم بنسبة 71,18%.

كلمات السر: النشاط البيولوجي، النباتات الطبية، النعناع البري، الفلافونويدات، متعددة الفينول.

