



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie
Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en
Biologie Cellulaire et Biochimie

Option
Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques
Présentée par

M^{elle} SELADJI Meryem

Thème

Etude phytochimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de cinq plantes médicinales et analyse de leurs huiles essentielles

Soutenue le : / / devant le jury composé de :

ATIK-BEKKARA Fawzia	Professeur (Université de Tlemcen)	Président
BELLAHCEN Miloud	Professeur (Centre Universitaire de Aïn-Témouchent)	Examineur
BENNACEUR Malika	Professeur (Université d'Oran 1)	Examineur
BOUCHERIT Kebir	Professeur (Centre Universitaire de Aïn-Témouchent)	Examineur
BEKHECHI Chahrazed	Maître de conférences (Université de Tlemcen)	Co-directeur de thèse
BENDIMERAD Nassima	Professeur (Université de Tlemcen)	Directeur de thèse

Année universitaire : 2014-2015

« Le meilleur médecin est la nature : elle
guérit les trois quarts des maladies et ne
dit jamais de mal de ses confrères. »

Louis Pasteur

Remerciements

Si cette thèse a été achevée, c'est, pour beaucoup, grâce à la collaboration et à l'assistance de nombreuses personnes à qui vont ma gratitude et ma reconnaissance. Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui, de près ou de loin y ont contribué.

Je commencerai tout d'abord par remercier « Dieu » Le Tout Puissant, qui m'a accordé la santé, la force et les moyens pour mener à terme ce travail.

Ma profonde gratitude va à Madame BENDIMERAD Nassima, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, tout en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de sa sagesse, de ses encouragements et surtout de son temps. Je tiens aussi à la remercier pour ses multiples conseils et toutes les heures qu'elle a consacrées en encadrant cette recherche. Merci de m'avoir aussi confié des responsabilités plus collectives, me laisser conduire ce travail librement et surtout pour son indulgence lorsque je m'égarais un peu ... Merci tout particulièrement pour le soutien humain dans la dernière ligne droite de la rédaction qui a été particulièrement ardue.

D'autre part, j'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à Madame BEKHECHI Chahrazed, Maître de Conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen pour avoir codirigé cette thèse. J'ai apprécié son soutien scientifique et pédagogique, et ses conseils avisés qui m'ont permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

Par ailleurs, je tiens, à exprimer ma sincère reconnaissance à Madame ATIK-BEKKARA Fawzia, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe : « Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) », me permettant ainsi d'effectuer ce travail de recherche dans les meilleures conditions, pour sa rigueur scientifique ainsi que pour ses qualités humaines. Je la remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur BELLAHCEN Miloud, Professeur au Centre Universitaire de Aïn-Témouchent, qui m'a fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.

A Madame BENNACEUR Malika, Professeur à l'Université d'Oran 1, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur BOUCHERIT Kebir, Recteur du Centre Universitaire de Aïn-Témouchent qui m'a fait l'honneur d'examiner ce modeste travail malgré ses multiples occupations. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus haute considération.

Ensuite, Monsieur CHABANE SARI Daoudi, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen et Directeur du Laboratoire des Produits Naturels « LAPRONA », pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire. J'y ai passé de très bons moments tant au niveau professionnel que relationnel.

Mes chaleureux remerciements vont également à Monsieur BENABADJI Noury, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour ses conseils et son aide si précieuse lors de l'échantillonnage et l'identification des différentes espèces.

J'adresse également mes remerciements les plus vifs, ma profonde reconnaissance et ma gratitude à Monsieur le Professeur TOMI Félix, Directeur du laboratoire «Chimie et Biomasse» de l'Université de Corse, pour les analyses des huiles essentielles. Il a mis à notre disposition l'ensemble des moyens analytiques disponibles dans son laboratoire et en particulier la technique d'analyse des mélanges naturels par RMN du carbone-13 mise au point et développée par l'équipe chimie de l'université de Corse.

Aussi, je voudrais exprimer cette reconnaissance à tous les Professeurs et Maîtres de Conférences du laboratoire qui m'ont toujours aidé, et à chaque fois que je les ai sollicités.

J'adresse mes remerciements à tous mes collègues doctorants du Laboratoire et en premier lieu à ma sœur, de cœur, Madame BENAMAR née DIB Hanane. J'ai beaucoup

appris en travaillant à ses côtés. Merci également pour toutes les discussions et moments que nous avons partagés, pour son écoute, son soutien, ses conseils, et ses encouragements, merci d'avoir toujours été présente.

Merci également à Monsieur TOUL Fethi, pour sa bonne humeur, toutes nos discussions partagées mais également pour son aide scientifique.

J'adresse un grand merci également à tous les membres actuels et à ceux qui ont fait parti du Laboratoire des Produits Naturels, pour tous les services rendus, les conseils, et pour toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensemble. Grâce à vous tous cette aventure a été riche et m'a beaucoup apporté.

Je n'oublie pas de remercier M. AMEL Slimane et M. DAHMANI Abdelkader pour leur aide matérielle.

Je tiens à remercier les personnes des différents laboratoires, qui m'ont aidé au cours de ces années de recherche. Et Houcine, ce gentil jeune homme du Sud, herboriste accompli, qui n'a ménagé ni son temps ni sa peine en nous accompagnant à plusieurs reprises sur les flancs des montagnes de Aïn Sefra (wilaya de Nâama) lors des cueillettes.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de ma famille qui a toujours été là pour moi. C'est pour cela que je leur dédie ce travail. Mes pensées vont à mes frères, mes sœurs et ma grand-mère pour leur présence et leurs encouragements durant toutes ces années.

Je n'oublierai pas mon « chauffeur », qui m'a rendu la tâche facile sur le terrain en m'épargnant la fatigue des longs allers-retours dans la journée : mon père.

Quant à ma mère, je sais qu'à travers uniquement son sourire, elle m'accompagne de sa bénédiction.

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, de l'Ouest d'Algérie, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des métabolites secondaires (phénols totaux, flavonoïdes, tanins, et huiles essentielles) ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de cinq espèces végétales *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*.

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants: Capacité antioxydante totale CAT, piégeage du radical libre DPPH, réduction de fer et blanchiment du β -carotène. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des micro-dilutions en milieu liquide. L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* et *Schinus molle* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CG) et CG couplée à la spectrométrie de masse ainsi que la RMN ^{13}C sans séparation préalable.

Les résultats obtenus ont montré une remarquable richesse des différentes parties des cinq plantes étudiées en métabolites secondaires à savoir : polyphénols, flavonoïdes, tanins et huiles essentielles. Les espèces *N. nepetella*, *M. rotundifolia* et *Atriplex canescens* se sont montrées riches en polyphénols dont la teneur varie entre 20,75 et 58,11 mg équivalents d'acide gallique (EAG)/ gramme de matière (MS). Pour les autres plantes, le contenu en polyphénols est compris entre 3,52 et 10,75 mg EAG/g MS. Les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés exprimées en équivalent de catéchine sont de l'ordre de 0,59 à 4,57 mg/g et 0,2 à 1,5 mg/g respectivement. Les résultats de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles varient quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée. 21 composés ont été identifiés dans les huiles essentielles de *N. nepetella* représentant 91,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, 17 pour les fleurs (92,9%) et 22 composés pour la partie aérienne (88,3%), le constituant nepetalactone 4 α ,7 α ,7 β est le prépondérant. 42 composés pour les parties aériennes ainsi que pour les feuilles, représentant 91,8% et 93,9% respectivement ont été identifiés dans les huiles de *M. rotundifolia* présentant le menthone, la pulégone et l'isomenthone comme constituants majoritaires. Pour *S. molle* 35 composés ont été identifiés représentant 89,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, et 39 pour les fruits (68,6%) avec l'alpha phellandrène comme constituant majoritaire au niveau des feuilles.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits des espèces végétales étudiées présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. Comparés aux autres espèces, les extraits des tanins des feuilles et des tiges de *M. rotundifolia* ont une importante activité de piégeage du radical libre DPPH (valeurs des IC₅₀ : 0,12 mg/ml et 0,08 mg/ml respectivement) comparable à celle des antioxydants de synthèse acide ascorbique et butylhydroxyanisole. Par ailleurs, ces extraits de *M. rotundifolia*, ceux méthanoliques des feuilles et des tiges de *N. nepetella*, ceux de *S. molle* et celui des tanins des tiges d'*A. canescens* ont montré une bonne capacité à inhiber le blanchiment du β -carotène. Concernant les autres extraits, *M. rotundifolia* et *S. molle* sont moins importants mais intéressants comparativement aux extraits de *M. arvensis* et *A. canescens* qui ont des activités plus faibles.

La majorité des extraits testés n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées. Cependant, Les huiles essentielles des différentes parties de *N. nepetella*, de *M. rotundifolia* et de *S. molle* montrent une sensibilité aux différentes souches testées et en particulier vis-à-vis des levures et des moisissures. De même, les huiles essentielles des parties aériennes de *M. rotundifolia* se sont avérées les plus actives en particulier contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI et une CMB de l'ordre de 1,25 $\mu\text{l/ml}$.

Mots clés : *Nepeta nepetella* ; *Mentha rotundifolia* ; *Moricandia arvensis* ; *Atriplex canescens* ; *Schinus molle* ; polyphénols ; flavonoïdes ; tanins ; huiles essentielles, composition chimique, activités antioxydantes ; activités antimicrobiennes.

Abstract

As part of the discovery of new active molecules from natural sources, we were interested in this work to the study of secondary metabolites (total phenols, flavonoids, tannins, and essential oils) and evaluation of antioxidant and antimicrobial extracts from five plant species in western Algeria: *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* and *Schinus molle*.

The polyphenol contents were determined by spectrophotometric techniques. The antioxidant activities were determined in vitro through the following evaluation tests: Total antioxidant capacity TAC, DPPH assay, Ferric reducing antioxidant power FRAP and inhibition of bleaching β -carotene. Moreover, determination of antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method and that of liquid-based micro-dilutions. The study of the chemical composition of essential oils of *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* and *Schinus molle* was performed by gas chromatography (GC) and GC with mass spectrometry and ^{13}C RMN.

The results obtained showed a remarkable wealth of different parts of the five plants studied secondary metabolites namely polyphenols, flavonoids, tannins and essential oils. The species *N. nepetella*, *M. rotundifolia* and *Atriplex canescens* have proved rich in polyphenols, whose content varies between 20.75 and 58.11 mg EAG / g DM. For other plants, the polyphenol content is between 3.52 and 10.75 mg EAG / g DM. The contents of flavonoids and condensed tannins expressed as catechin equivalents are in the range of 0.59 to 4.57 mg / g and 0.2 to 1.5 mg / g respectively. The study of the chemical composition of essential oils was carried out by GC, GC / SM and RMN ^{13}C .

The results of chemical analysis of these essential oils vary quantitatively depending on the part of the plant studied. The study of essential oils *N. nepetella* identified 21 compounds representing 91.3% of the total composition of the essential oil from the leaves, the flowers 17 (92.9%) and compound 22 aerial part (88.3%), that of *M. rotundifolia* identified 42 compounds for the aerial part and for leaves, representing 91.8% and 93.9% respectively, and that of *S. molle* allowed identified 35 compounds representing 89.3% of the total composition of the essential oil from the leaves, fruit and 39 (68.6%).

The methods of the antioxidant activity show that all samples studied plant species exhibit antioxidant properties in different levels. Compared to other species, extracts tannins from leaves and stems of *M. rotundifolia* have significant scavenging activity of free radical DPPH (IC_{50} values of 0.12 mg / ml and 0.08 mg / ml respectively) comparable to that of the synthetic antioxidants ascorbic acid and butylated hydroxyanisole. Moreover, these extracts of *M. rotundifolia*, those methanolic leaves and stems of *N. nepetella*, those *S. molle* and tannins stems from *A. canescens* showed good ability to inhibit β -carotene bleaching. Regarding other extracts, *M. rotundifolia* and *S. molle* are less important but interesting compared to extracts from *M. arvensis* and *A. canescens* which have lower activities.

Most extracts tested had no inhibitory effect against the growth of all microbial strains tested. However, Essential oils of different parts of *N. nepetella*, *M. rotundifolia* and *S. molle* show sensitivity to different tested strains and in particular to the yeasts and molds. Similarly, the essential oils of the aerial parts of *M. rotundifolia* proved most active in particular against *Staphylococcus aureus* with MIC and MBC of about 1.25 $\mu\text{l}/\text{ml}$.

Keywords: *Nepeta nepetella*; *Mentha rotundifolia*; *Arvensis Moricandia*; *Atriplex canescens*; *Schinus molle*; Polyphenols; Flavonoids; Tannins; essential oils, chemical composition, antioxidant activities; antimicrobial activities.

ملخص

في إطار اكتشاف جزيئات جديدة نشطة من مصادر طبيعية، اهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الثانوية (متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية والزيوت العطرية) وتقييم النشاطات المضادة للأكسدة و المضادة للميكروبات لمستخلصات خمسة أنواع من النباتات من الغرب الجزائري : *Nepeta nepetella*، *Mentha rotundifolia*، *Moricandia arvensis*، *Atriplex canescens* و *Schinus molle*.

تم تحديد محتويات متعدد الفينول من خلال تقنيات الطيف الضوئي. وتم تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة، مخبريا، من خلال الطرائق التالية: القدرة المضادة للأكسدة الكلية، تثبيط الجذر الحر DPPH، والقدرة على إرجاع الحديد و تثبيط إزالة لون البيتا كاروتين. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة الإنتشار القرصي وطريقة التخفيف في وسط سائل. كما قمنا أيضا بدراسة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية ل *Nepeta nepetella*، *Mentha rotundifolia* و *Schinus molle* بواسطة التحليل الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية مقرونة بمطيافية الكتلة و الطنين النووي المغناطيسي للكربون 13 من دون فصل مسبق للزيوت العطرية. أظهرت النتائج المحصل عليها أن مختلف أجزاء النباتات الخمس تحتوي على نسب عالية من المركبات الثانوية : متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية والزيوت العطرية. النباتات التالية: *Nepeta nepetella*، *Mentha rotundifolia* و *Atriplex canescens*، أظهرت عن محتويات مرتفعة في ما يخص متعدد الفينول بكميات تراوحت بين 20.75 إلى 58.11 مغ معادل حمض الغاليك/غ من المادة الجافة. أما بالنسبة للنباتات الأخرى، فكان محتواها مترواحا بين 3.52 إلى 10.75 مغ معادل حمض الغاليك/غ من المادة الجافة. محتوى النباتات في ما يخص الفلافونويدات و المركبات العفصية تراوح بين 0.59 إلى 4,57 مغ معادل الكاتشين/غ من المادة الجافة و بين 0.2 إلى 1.5 مغ معادل الكاتشين/غ من المادة الجافة، بالترتيب.

أظهرت نتائج دراسة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية اختلافا كليا على حسب الجزء من النبات. تم تحديد 21 مركبا في الزيوت العطرية ل *Nepeta nepetella* و التي تمثل 91.3 % من التركيبية الإجمالية للزيوت العطرية للأوراق، و 17 مركبا بالنسبة للأزهار (92.9 %)، و 22 مركبا بالنسبة للجزء الجوي لهذه النبتة (88.3 %). المكونة نيبيتالاكتون $\alpha 4$ ، 7α ، 7β مثلت المركب الرئيسي. وقد تم تحديد 42 مركبا للجزء الجوي وللأوراق، وهو ما يمثل 91.8 % و 93.9 % على الترتيب، في الزيوت العطرية ل *Mentha rotundifolia* مع مركب المنتون، البيلاجون و الإيزومنتون كمكونات رئيسية. بالنسبة ل *Schinus molle*، 35 مركبا تم تحديده و الذي يمثل 89.3 % من إجمالي التركيبية الإجمالية للزيوت العطرية للأوراق و تم تحديد 39 مركبا بالنسبة للثمار (68.6 %) مع مركب الألفا فيلاندرين كمركب رئيسي في الزيوت العطرية للأوراق.

مختلف طرائق دراسة النشاط المضاد للأكسدة تبين أن جميع المستخلصات للنباتات المدروسة تملك خصائص مضادة للأكسدة لكن بمستويات مختلفة. مستخلصات المركبات العفصية لأوراق *Mentha rotundifolia* نبتة أظهرت النشاط المضاد للأكسدة العالي بالمقارنة مع مستخلصات النباتات الأخرى. تم الحصول على أفضل نشاط، مقارنة مع المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية، من خلال طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH ممثلة بقيمة IC_{50} ب 0.12 مغ/مل و 0.08 مغ/مل، على الترتيب. مستخلصات الكحول الميثيلي لأوراق و سيقان نبتة *Nepeta nepetella* و *Schinus molle* بالإضافة إلى مستخلص المركبات العفصية لسيقان نبتة *Atriplex canescens* أظهرت قدرة جيدة على تثبيط إزالة لون البيتا كاروتين. أما في ما يخص مستخلصات نبتتي *Mentha rotundifolia* و *Schinus molle*، فقد أبانوا عن نشاط مضاد للأكسدة معتبر لكنه أكثر أهمية مقارنة بمستخلصات *Moricandia arvensis* و *Atriplex canescens*. أغلبية المستخلصات المدروسة لم تؤثر على نمو مختلف السلالات الميكروبية المجربة. مع ذلك، أظهرت الزيوت العطرية حساسية لمختلف السلالات المجربة *Schinus molle* و *Mentha rotundifolia*، *Nepeta nepetella* لمختلف أجزاء نشاطا *Mentha rotundifolia* و خاصة اتجاه الخمائر و الفطريات. أظهرت أيضا الزيوت العطرية للأجزاء الجوية لنبتة فعلا اتجاه البكتيريا العنقودية الذهبية أدنى حد تركيز مثبط 1,25 مغ/مل

الكلمات المفتاحية: *Nepeta nepetella*، *Mentha rotundifolia*، *Moricandia arvensis*، *Atriplex*، متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية، الزيوت العطرية، التركيب الكيميائي، *Schinus molle*، *canescens*، الأنشطة المضادة للأكسدة، الأنشطة المضادة للميكروبات.

Table des matières

Remerciements	ii
Résumés	v
Table des matières	viii
Liste des abréviations	xiii
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xviii
Introduction générale	1
Première partie : Synthèse bibliographique	5
Chapitre 1. Présentation des plantes sélectionnées	6
I. Présentation de la famille des lamiacées	6
I.1. Description botanique des lamiacées	6
I.1.1. Le genre <i>Nepeta</i>	6
a. Présentation de la plante <i>Nepeta nepetella</i> L.	7
b. Description botanique et systématique de la plante	7
c. Usages thérapeutiques	8
d. Travaux antérieurs	8
I.1.2. Le genre <i>Mentha</i>	8
a. Présentation de la plante <i>Mentha rotundifolia</i> L.	8
b. Description botanique et systématique de la plante	9
c. Usages thérapeutiques	10
d. Travaux antérieurs	10
II. Présentation de la famille des brassicacées	11
II.1. Description botanique des brassicacées	12
a. Présentation de la plante <i>Moricandia arvensis</i>	12
b. Description botanique et systématique de la plante	12
c. Usages thérapeutiques	13
d. Travaux antérieurs	14
III. Présentation de la famille des amaranthacées	14
III.1. Description botanique des chénopodiacées	15

a. Présentation de la plante <i>Atriplex canescens</i>	15
b. Description botanique et systématique de la plante	15
c. Usages thérapeutiques	17
d. Travaux antérieurs	17
IV. Présentation de la famille des anacardiées	17
a. Description botanique et systématique de la plante	17
b. Usages thérapeutiques	19
c. Travaux antérieurs	19
Chapitre 2. Généralités sur les activités biologiques	20
I. Activité antioxydante	20
I.1. Généralités	20
I.2. Mécanismes de l'oxydation	21
I.3. Mécanismes d'action des antioxydants	22
I.4. Sources d'antioxydants	22
II. Activité antimicrobienne	26
II.1. Généralités	26
II.2. Mécanismes d'action et de résistance des agents antimicrobiens	26
Chapitre 3. Techniques d'analyses des huiles essentielles	28
I. Identification des constituants d'un mélange complexe	28
I.1. Méthodes d'analyses par couplage (chromatographie-spectroscopie)	30
I.2. Identification des constituants après purification	31
I.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable	31
Deuxième partie : Matériel et méthodes	35
Chapitre 1. Screening phytochimique, extraction des composés phénoliques	
et leurs teneurs	36
I. Origine géographique et période de récolte du matériel végétal	36
I.1. Identification botanique	38
I.2. Préparation des échantillons	38
II. Tests phytochimiques	38
II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud	38
II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol	40
II.3. Epuisement du matériel végétal avec de l'éther diéthylique	42
III. Extractions sélectives et dosages	44

III.1. Extraction des composés phénoliques	44
III.1.1. Préparation des extraits bruts secs	44
III.2. Dosage des phénols totaux	44
III.3. Dosage des flavonoïdes	45
III.4. Extraction des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes	46
III.5. Extraction des tanins	46
III.6. Dosage des tanins condensés	46
III.7. Calcul du rendement	47
Chapitre 2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de <i>Nepeta nepetella</i> , <i>Mentha rotundifolia</i> et <i>Schinus molle</i>	48
I. Extraction des huiles essentielles	48
II. Analyses des huiles essentielles	48
II.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	49
II.2. Spectrométrie de masse (SM)	49
II.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	50
Chapitre 3. Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des différents extraits de plantes	52
I. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes	52
I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	52
I.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH	52
I.3. Méthode de la réduction du fer (FRAP)	53
I.4. Test du blanchiment du β -carotène	54
I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles	55
I.6. Analyse statistique	55
II. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes	56
II.1. Souches bactériennes et fongiques testées	56
II.2. Méthode de diffusion sur disque	57
II.3. Méthode de micro-dilution en milieu liquide	58
Troisième partie : Résultats et discussion	59
Chapitre 1. Screening phytochimique, extraction des composés phénoliques et leurs teneurs	60
I. Tests phytochimiques	60
II. Les composés phénoliques	63

II.1. Rendements des extraits bruts obtenus	63
II.2. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés	64
II.2.1. Courbes d'étalonnages des dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés	64
II.2.2. Analyses quantitatives des extraits	66
a. Extraits de <i>Nepeta nepetella</i>	66
b. Extraits de <i>Mentha rotundifolia</i>	67
c. Extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	68
d. Extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	68
e. Extraits de <i>Schinus molle</i>	69
Chapitre 2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de <i>Nepeta nepetella</i> , <i>Mentha rotundifolia</i> et <i>Schinus molle</i>	72
I. Rendements en huiles essentielles	72
II. Composition chimique des huiles essentielles	73
II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>N. nepetella</i>	73
II.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	82
II.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. molle</i>	87
Chapitre 3. Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des différents extraits de plantes	94
I. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes	94
I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	94
a. Extraits de <i>Nepeta nepetella</i>	95
b. Extraits de <i>Mentha rotundifolia</i>	95
c. Extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	96
d. Extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	97
e. Extraits de <i>Schinus molle</i>	98
I.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH	99
a. Extraits de <i>Nepeta nepetella</i>	99
b. Extraits de <i>Mentha rotundifolia</i>	99
c. Extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	100
d. Extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	101
e. Extraits de <i>Schinus molle</i>	102
I.3. Méthode de la réduction de fer (FRAP)	105
a. Extraits de <i>Nepeta nepetella</i>	105

b. Extraits de <i>Mentha rotundifolia</i>	106
c. Extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	107
d. Extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	107
e. Extraits de <i>Schinus molle</i>	108
I.4. Test du blanchiment du β -carotène	109
a. Extraits de <i>Nepeta nepetella</i>	109
b. Extraits de <i>Mentha rotundifolia</i>	110
c. Extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	111
d. Extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	112
e. Extraits de <i>Schinus molle</i>	113
I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles	115
II. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes	118
II.1. Méthode de diffusion sur disque	118
II.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide	126
Conclusion générale	128
Références bibliographiques	132
Annexes	156
Travaux personnels	

Liste des abréviations

% : Pourcentage

[C] : Concentration

°C : Degré Celsius

AA : Acide ascorbique

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG : Acide gallique

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CAT : Capacité antioxydante totale

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

GPx : Glutathion Peroxydase

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

IP : Institut Pasteur

M : Molaire

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

mg EAG/g : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mg EC/g : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

min : Minutes

ml : Millilitre

MS : Matière sèche

n-BuOH : n-butanol

nm : Nanomètre

PDA : Potatose Dextrose Agar

RMN : Résonance magnétique nucléaire

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet

µg : Microgramme

Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>Nepeta nepetella</i>	7
Figure 2 : Photo de <i>Mentha rotundifolia</i>	9
Figure 3 : Photo de <i>Moricandia arvensis</i>	13
Figure 4 : Photo d' <i>Atriplex canescens</i>	16
Figure 5 : Photo de <i>Schinus molle</i>	18
Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes	24
Figure 7 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe	29
Figure 8 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13	34
Figure 9 : Situation géographique des stations d'étude	37
Figure 10 : Rendements en (%) des extraits bruts aqueux et méthanoliques des plantes étudiées	63
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	65
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	65
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	66
Figure 14 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de <i>N. nepetella</i>	67
Figure 15 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de <i>M. rotundifolia</i>	67
Figure 16 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de <i>M. arvensis</i>	68
Figure 17 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et tanins dans les extraits bruts d' <i>A. canescens</i>	69
Figure 18 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de <i>Schinus molle</i>	69

Figure 19 : Rendements en huiles essentielles de <i>N. nepetella</i> , <i>M. rotundifolia</i> et <i>S. molle</i> obtenus par entraînement à la vapeur d'eau	72
Figure 20 : Chromatogrammes des feuilles de <i>Nepeta nepetella</i> sur colonne apolaire et polaire	73
Figure 21 : Chromatogramme des fleurs de <i>Nepeta nepetella</i> sur colonne apolaire et polaire	74
Figure 22 : Chromatogrammes des parties aériennes de <i>Nepeta nepetella</i> sur colonne apolaire et polaire	75
Figure 23 : Composés volatils présents dans les feuilles de <i>Nepeta nepetella</i>	78
Figure 24 : Composés volatils présents dans les fleurs de <i>Nepeta nepetella</i>	78
Figure 25 : Composés volatils présents dans les parties aériennes de <i>Nepeta nepetella</i>	78
Figure 26 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des différentes parties de <i>Nepeta nepetella</i>	79
Figure 27 : Chromatogrammes des parties aériennes de <i>Mentha rotundifolia</i> sur colonne apolaire et polaire	82
Figure 28 : Composés volatils présents dans les parties aériennes de <i>Mentha rotundifolia</i>	85
Figure 29: Composés volatils présents dans les feuilles de <i>Mentha rotundifolia</i>	85
Figure 30: Comparaison des teneurs en composés majoritaires des parties aériennes et des feuilles de <i>Mentha rotundifolia</i>	85
Figure 31: Chromatogrammes des feuilles de <i>Schinus molle</i> sur colonne apolaire et polaire	87
Figure 32 : Chromatogrammes des fruits de <i>Schinus molle</i> sur colonne apolaire et polaire	88
Figure 33 : Composés volatils présents dans les feuilles de <i>Schinus molle</i>	91
Figure 34 : Composés volatils présents dans les fruits de <i>Schinus molle</i>	91
Figure 35 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des feuilles et des fruits de <i>Schinus molle</i>	91
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la mesure de la capacité antioxydante totale	94

Figure 37 : Capacité antioxydante totale des extraits de <i>N. nepetella</i>	95
Figure 38 : Capacité antioxydante totale des extraits de <i>M. rotundifolia</i>	96
Figure 39 : Capacité antioxydante totale des extraits de <i>M. Arvensis</i>	97
Figure 40 : Capacité antioxydante totale des extraits d' <i>A. canescens</i>	98
Figure 41 : Capacité antioxydante totale des extraits de <i>Schinus molle</i>	98
Figure 42 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de <i>N. nepetella</i>	99
Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de <i>M. rotundifolia</i>	100
Figure 44 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits d' <i>Atriplex canescens</i>	101
Figure 45 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de <i>Moricandia arvensis</i>	102
Figure 46 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de <i>Schinus molle</i>	103
Figure 47 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Nepeta nepetella</i>	106
Figure 48 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Mentha rotundifolia</i>	106
Figure 49 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Moricandia arvensis</i>	107
Figure 50 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Atriplex canescens</i>	108
Figure 51 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des fruits de l'espèce <i>Schinus molle</i>	109
Figure 52 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Nepeta nepetella</i>	110
Figure 53 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Mentha rotundifolia</i>	111
Figure 54 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce <i>Moricandia arvensis</i>	111

- Figure 55** : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Atriplex canescens* **112**
- Figure 56** : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Schinus molle* **113**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Situation géographique des stations de récolte	36
Tableau 2 : Les différentes souches microbiennes testées	56
Tableau 3 : Résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les différentes parties des espèces végétales étudiées	62
Tableau 4 : Rendements et dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés des extraits bruts aqueux et méthanoliques	70
Tableau 5 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Nepeta nepetella</i>	76
Tableau 6 : Bilan de l'étude des huiles essentielles de <i>Nepeta nepetella</i>	77
Tableau 7 : Comparaison de teneurs en composés nepetalactones de nos échantillons avec celles de la littérature	81
Tableau 8 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Mentha rotundifolia</i>	83
Tableau 9 : Bilan de l'étude des huiles essentielles de <i>Mentha rotundifolia</i>	84
Tableau 10 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Schinus molle</i>	89
Tableau 11 : Bilan de l'étude des huiles essentielles de <i>Schinus molle</i>	90
Tableau 12 : Comparaison de teneurs en composés majoritaires de nos échantillons avec celles de la littérature	92
Tableau 13 : Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits des cinq espèces végétales étudiées	104
Tableau 14 : Valeurs des IC ₅₀ du test de blanchiment du β-carotène des différents extraits des espèces végétales étudiées	114
Tableau 15 : Valeurs des IC ₅₀ des différentes huiles essentielles étudiées	116
Tableau 16 : Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits des cinq espèces végétales étudiées relatives aux souches testées selon la méthode des disques	119
Tableau 17 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles les plus actives	126

Introduction générale

La flore algérienne est caractérisée par la diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale estimée à plus de 3 000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (5%) d'espèces endémiques (**Ozenda, 1977**). L'investigation de ces espèces représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances.

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). Chacune de ces plantes peut contenir des centaines voire des milliers de métabolites secondaires, ou de principes actifs qui peuvent produire différentes actions physiologiques sur le corps humain (**Edeoga et al., 2005**).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés, on retrouve les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes et les coumarines (**Bahorun et al., 1996**).

Plusieurs antioxydants de synthèse tels que le butylhydroxytoluène et le butylhydroxyanisole sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour prévenir la détérioration des aliments. Bien que ces antioxydants synthétiques montrent une activité antioxydante plus puissante que celle des antioxydants naturels comme l'acide ascorbique et l' α -tocophérol (**Bougatef et al., 2009**), il y a une préoccupation concernant leurs effets néfastes sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse (**Gulcin et al., 2005**).

De même, le traitement par les antibiotiques classiques est associé à plusieurs effets indésirables, l'émergence importante d'espèces bactériennes résistantes ainsi que les inconvénients associés au traitement avec les antibiotiques incompatibles avec l'administration externe du patient comme le prolongement du séjour à l'hôpital et l'exposition aux infections nosocomiales (**Song, 2008**).

Ce sont les raisons pour lesquelles, la recherche scientifique s'est focalisée récemment sur l'investigation de nouveaux agents antioxydants et antibactériens d'origine végétale particulièrement les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes et tanins) qui peuvent être des alternatifs aux substances synthétiques (**Bougatef et al., 2009**).

Les espèces végétales peuvent être une source de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes, pour cela notre laboratoire et particulièrement notre équipe s'intéresse de très près à la chimie et aux activités biologiques (antioxydantes et antimicrobiennes) des extraits végétaux des plantes soupçonnées médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels (**Atik Bekkara et al., 2007 ; Bendimerad et al., 2007 ; Benhammou et al., 2009 ; Benabadji et al., 2010 ; Bekhechi et al., 2012 ; Benhammou et al., 2013 ; Belmekki et al., 2013 ; Kassemi et al., 2013 ; Mazari et al., 2013**).

En vu d'apporter une contribution à la connaissance de cinq espèces végétales de l'Ouest algérien notamment *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*, notre travail a été réalisé en trois parties :

✓ Dans la première partie, une synthèse bibliographique menée sur les cinq espèces sélectionnées, *N. nepetella*, *M. rotundifolia*, *M. arvensis*, *A. canescens* et *S. molle*, sur les métabolites secondaires, les huiles essentielles et leurs activités biologiques, ainsi que sur les différentes techniques d'analyse des huiles essentielles.

✓ Dans la deuxième partie, le travail est expérimental qui consiste en :

➤ Détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique des différentes parties des espèces étudiées ;

➤ Préparation des extraits bruts secs aqueux et méthanolique et détermination des rendements.

➤ Extractions sélectives des familles prépondérantes : composés phénoliques, tanins ; fractions flavonoïdiques (acétate d'éthyle et n-butanol) de l'ensemble des différentes parties des espèces étudiées (*N. nepetella*, *M. rotundifolia*, *M. arvensis*, *A. canescens* et *S. molle*).

➤ Dosage de principales classes phénoliques : les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins.

➤ Extraction et détermination des rendements en huiles essentielles ;

- Analyse de la composition chimique des huiles essentielles des espèces sélectionnées.
 - Evaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant des cinq espèces sélectionnées au moyen de quatre tests (Capacité antioxydante totale, piégeage du radical libre DPPH, réduction de fer et blanchiment du β -carotène) ;
 - Evaluation du pouvoir antimicrobien de extraits (aqueux, méthanolique, fraction acétate, fraction n-butanol, tanins et huile essentielle) sur cinq souches bactériennes, deux à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*), trois à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*), une levure (*Candida albicans*) et deux champignons filamenteux (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*).
- ✓ Dans la troisième partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude et notre travail sera achevé par une conclusion générale et des perspectives quant à l'utilisation de ces différentes plantes dans les secteurs agroalimentaires et cosmétiques.

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Présentation des plantes sélectionnées

La position géographique de l'Algérie lui confère une flore très diversifiée qui intéresse de plus en plus les chercheurs. La curiosité, la possibilité d'identification des particularités et vertus de chaque plante guide notre intérêt croissant pour une meilleure valorisation de toute espèce végétale utilisée ou non en médecine traditionnelle.

I. Présentation de la famille des lamiacées

La famille des Lamiacées est d'une grande importance économique à large utilisation, représentée par des plantes cosmopolites, mais à concentration importante dans les régions méditerranéennes.

C'est une importante famille des plantes dicotylédones, qui comprend environ 4 000 espèces et près de 210 genres (Naghbi et al., 2005). Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart des ces espèces sont bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (Judd et al., 2002).

I.1. Description botanique des lamiacées

Ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à poils glanduleux, en générale aromatiques. Leurs tiges sont carrées, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portent des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminale plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, les corolles sont généralement caduque et à 2 lèvres (rarement 1). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine (Guignard, 1979).

I.1.1. Le genre *Nepeta*

Le genre *Nepeta* (Lamiacées) comprend environ 400 espèces, dont la plupart à l'état sauvage en Europe centrale et méridionale ; en Afrique du Nord et centrale et en Asie du Sud. Un grand nombre d'espèces de ce genre est utilisé dans la médecine traditionnelle.

a. Présentation de la plante *Nepeta nepetella* L.

Cette petite plante odorante est une habituée des pentes rocailleuses bien ensoleillées. Le néophyte la confond souvent avec de la menthe à cause de son odeur mentholée (**Figure 1**).



Figure 1 : Photo de *Nepeta nepetella* (Aïn Sefra-Nâama, Mai 2012)

b. Description botanique et systématique de la plante

Les bractées florales squamiformes sont très petites, les inflorescences en courtes cymes axillaires très lâches. La plante grisâtre à feuilles lancéolées crénelées de 1-2×0,4-0,8 cm, fleurs bleues, tiges très rameuses (**Quézel et Santa, 1963**).

Selon l'APG II (**Dupont et Guignard, 2007**)

Règne : Végétal
Embranchement : Spermaphytes
Sous-embranchement : Angiospermes
Classe : Eudicots
Sous-classe : Euastéridées I
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiacées
Genre : *Nepeta*
Espèce : *Nepeta nepetella* L.

c. Usages thérapeutiques

Les espèces du genre *Nepeta* sont employées pour leur propriété analgésique, (Bouidida et al., 2008). Elles possèdent également des propriétés antidépresseurs (Bernardi et al., 2010) et anxiolytique (Rabbani et al., 2008).

d. Travaux antérieurs

Le genre *Nepeta* qui est largement utilisée en industries cosmétiques et alimentaires a fait l'objet de nombreux travaux notamment sur la composition chimique des huiles essentielles (Ghannadi et al., 2003 ; Mehrabani, 2004 ; Sajjadi, 2005 ; Karaman et Comlekç Io go lu, 2007 ; Hassan et al., 2011 ; Mothana, 2012 ; Rather et al., 2012), ainsi que sur les activités biologiques principalement antifongiques des huiles essentielles (Ljaljeviã Grbiã et al., 2007) et des extraits aqueux qui se sont avérés actifs (Bandh et al., 2011).

L'espèce *Nepeta nepetella* a fait l'objet d'une seule étude sur la composition chimique de ses huiles essentielles qui contiennent des diastéréoisomères de nepetalactones (Velasco-Negueruela et al., 1990). Une autre étude a porté sur la relation écologique plante-sol, ainsi des mesures réfractométriques des huiles essentielles et l'application de la méthode électrométrique pour la détermination du potentiel rédox a montré une variabilité considérable sur vingt échantillons étudiés (Oana et al., 2003).

I.1.2. Le genre *Mentha*

Le genre *Mentha* est principalement distribué dans les régions tempérées et sub-tempérées du monde (Bhat et al., 2002). Ce genre comporte plus de 25 espèces, principalement des herbes éternelles s'élevant d'une manière extravagante dans les endroits humides ou dans toutes les régions tempérées de l'Eurasie, de l'Australie et de l'Afrique du Sud (Lange et Croteau, 1999). Les menthes les plus communes et les plus populaires pour la culture sont *M. piperita* L. et *M. spicata* L.

a. Présentation de la plante *Mentha rotundifolia* L.

La menthe vient du latin *mentha*, qui dévie lui-même du grec *Minthê* ou *Mintha*, elle est généralement connue sous le nom de menthe ou pudina, c'est l'herbe la plus commune qui a été connue pour ses propriétés médicinales et aromathérapeutique depuis des époques antiques.

La menthe est mentionnée dans la pharmacopée islandaise du 13^{ème} siècle tandis qu'il y a également rapport de sa culture en Chine pendant la dynastie de Ming (1368 -1644) (**Dai, 1981**).

L'espèce *Mentha rotundifolia* (*longifolia*) est considérée aujourd'hui comme un hybride *M. longifolia* x *M. suaveolens* (**Lawrence, 2007**).

Noms communs **Eberhard et al., (2005)** :

- En Français : Menthe odorante, Menthe simple
- En Arabe : Domrane, Chachtro, Timijo

b. Description botanique et systématique de la plante

L'espèce *Mentha rotundifolia* est une plante à feuilles ovales obtuses moins de deux fois longues que large, ridées en réseau. C'est une plante pubescente à épis florifères grêles et allongés. Les feuilles sensibles sont ovales ou elliptiques, obtuses ou subaiguës, épaisses, crénelées ou dentées, tomenteuses en dessous. Les fleurs blanches ou rosées sont en épis terminaux, cylindracés-coniques, aigus, bractées lancéolées-acuminées, ciliées. Le calice velu, court, en cloche, à gorge nue et non contactée, à 5 dents brièvement triangulaires-lancéolées. La corolle glabre en dedans, les carpelles ovoïdes et lisses (**Quézel et Santa, 1963 ; Coste, 2002**) (**Figure 2**).



Figure 2 : Photo de *Mentha rotundifolia* (Lala Setti-Tlemcen, Mars 2013)

Cette espèce est classée selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007)

Embranchement : Spermaphytes
Sous-embranchement : Angiospermes
Classe : Eudicots
Sous-classe : Euastéridées I
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiacées
Genre : *Mentha*
Espèce : *Mentha rotundifolia* L.

c. Usages thérapeutiques

Les espèces du genre *Mentha* ont été employées comme un remède folklorique pour le traitement des nausées, de la bronchite, de l'anorexie, de la colite ulcéreuse, et des plaintes de foie dues à son inflammation. Elles possèdent également des propriétés carminatives, antiémétiques, antispasmodiques, analgésiques, stimulantes, emménagogues, et anticatarrhales (Cowan, 1999 ; Iscan *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2002).

La menthe fait disparaître les impuretés du sang et restitue à la peau et au visage, la fraîcheur de la santé, car elle évite la formation des toxines, par son haut pouvoir bactéricide, et antiseptique qui entrave la putréfaction des matières intestinales (Bardeau, 1986). Elle combat l'haleine fétide et donne aussi des résultats contre la goutte et les rhumatismes (Bardeau, 1976 ; Bardeau, 1986 ; Leclerc, 1988).

Les huiles essentielles et/ou les extraits de quelques espèces de *Mentha* telles que *M. spicata*, *M. piperita*, *M. arvensis*, *M. rotundifolia*, *M. suaveolens*, et *M. pulegium* possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Economou *et al.*, 1991 ; Kaur et Kapoor, 2002 ; Daferera *et al.*, 2003).

d. Travaux antérieurs

Le genre *Mentha* incluant 18 espèces et 11 hybrides, a été sujet de beaucoup de travaux. Au Japon, Shimizu (1956) avait isolé à l'époque une cétone, la rotundifolone.

Ce genre a révélé l'existence d'un important polymorphisme (Lawrence, 1978). Plusieurs variétés et chémotypes ont été décrits pour *Mentha spicata* (Kokkini et Vokou,

1989 ; Misra et al., 1989 ; Pino et al., 1998), *Mentha longifolia* (Maffei, 1988 ; Venskutonis, 1996), *Mentha diemenica* (Brophy et al., 1996) *Mentha suaveolens* (Hendriks et Van Os, 1976) et bien d'autres.

La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* L. Huds (hybride entre *M. longifolia* et *M. suaveolens*) poussant dans différentes régions dans le monde a fait l'objet de beaucoup d'études (Nagell et Hefendehl, 1974 ; Hendriks et al., 1976 ; Kokkini et Papageorgiou, 1988 ; Umemoto, 1998 ; Lorenzo et al., 2002).

L'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* a montré des similarités avec l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (syn = *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson) du nord de l'Afrique (Algérie, Maroc) (Pérez Raya et al., 1990 ; Ouzmil et al., 2002 ; Brada et al., 2006). *Mentha suaveolens* du Maroc est riche en pulégone (El Arch et al., 2003), alors que le *cis-p*-menthenolide est considéré comme marqueur de sous-espèce (Sutour et al., 2008 ; Sutour et al., 2010).

Les huiles essentielles de *M. rotundifolia* ont montré l'existence de deux chémotypes l'un à « oxyde de pipéritone » et le second à « pipériténone » caractérisés par des teneurs différenciées (Brada et al., 2006 ; Brada et al., 2007).

L'huile essentielle de *M. suaveolens*, les extraits éthanolique et décocté ont été testé *in vitro* pour leurs effets inhibiteurs sur l'acétylcholine estérase ainsi que leurs activités antioxydantes (Ferreira et al., 2006).

Les essences de *M. rotundifolia* possèdent des propriétés antimicrobiennes (Ladjel et al., 2011).

Récemment, l'extrait des feuilles de *Mentha rotundifolia* s'est avéré ayant un effet inhibiteur de la corrosion de l'acier (Khadraoui et al., 2014).

II. Présentation de la famille des brassicacées

Dans la classification botanique, la famille des crucifères (*Cruciferae*) constitue une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones. Elle regroupe approximativement 340 genres et 3 350 espèces (Warwick et al., 2000). Toutefois, le genre principal est celui de *Brassica* d'où le nom de brassicacées (*Brassicaceae*).

Des cultures de *Brassica* ont été liées à la réduction du risque des maladies chroniques comprenant les maladies cardio-vasculaires et le cancer.

Les crucifères peuplent la presque totalité des habitats : roches maritimes, jardins, talus calcaires, pelouses humides ou sèches et les bords des chemins.

Elles jouent un grand rôle dans la physionomie du Sahara septentrional et central où elles comptent des espèces très communes, mais leur importance relative décroît rapidement lorsqu'on avance plus au sud (**Ozenda, 1958**).

Cette famille est homogène, les fleurs et les fruits sont toujours constitués selon le même plan d'ensemble. En effet, c'est la disposition en croix des pièces de la corolle qui permet de reconnaître immédiatement une crucifère (du latin: "cruces ferre"), d'où le nom donné à cette famille (**Ozenda, 1958 ; Maire, 1976**).

Cependant, de nombreuses espèces sont cultivées, certaines pour la production d'huile, d'autres comme condiments ou plantes d'ornement (**Fahey et al., 2001**), ou alors comme source alimentaire et de fourrage (**Nagy et al., 1978 ; Humphries, 1980 ; Savangika et Ohshima, 1987 ; Gupta et al., 1988**). Ce qui place, économiquement, cette famille parmi les plus importantes.

II.1. Description botanique des brassicacées

La classification a été l'objet de plusieurs modifications depuis celle de Schultz (**Schulz, 1936**). Plusieurs tribus et genres ont fait que cette famille est souvent considérée comme difficile pour une classification taxonomique. Cette classification du genre et les relations systématiques des "sous tribus" dans les crucifères n'est pas encore résolue et est en cours d'étude actuellement.

La composition chimique, en plus de la morphologie, l'anatomie et la cytogénétique, est un outil majeur pour les botanistes qui procèdent à la classification des plantes. Elle repose essentiellement sur la forme et la structure du fruit, sur l'embryon qui est replié sur lui-même dans la graine, sur la forme de stigmates et sur la pilosité de la plante.

a. Présentation de la plante *Moricandia arvensis*

Le genre *Moricandia* inclut cinq espèces distribuées en Afrique du Nord, l'Europe occidentale et au Sud de l'Asie (**Pottier-Alapetite, 1979**).

Moricandia arvensis est une plante qui fait partie de la famille des brassicacées originaires des régions semi-arides méditerranéennes (**Tahir et al., 2011**).

b. Description botanique et systématique de la plante

Les tiges sont de 30 à 40 cm. Elles portent des feuilles basales et obovales plus ou moins sinuées, ne formant pas de rosette. Les fleurs, visibles depuis la fin du mois de juin jusqu'en août, d'un joli violet, ne dépassant pas les 2 cm. Les fruits sont des siliques à bec court (1 à 3 mm). Les graines sont très petites et très nombreuses (**Quézel et Santa, 1963**) (**Figure 3**).



Figure 3 : Photo de *Moricandia arvensis* (Ain Sefra-Nâama, Mai 2013)

Cette espèce est classé selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007)

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous-classe : Eurosidées II

Ordre : Brassicales

Famille : Brassicacées

Genre : *Moricandia*

Espèce : *Moricandia arvensis* (L.) DC.

c. Usages thérapeutiques

Les plantes de Brassica sont très nutritives, favorisant la santé à travers leur contenu en vitamines, en caroténoïdes, en fibres, en sucres solubles, en minéraux, en glucosinolates et en composés phénoliques (Podsedeck, 2007 ; Jahangir et al., 2009).

Moricandia arvensis est une plante utilisée pour ses qualités antiscorbutiques (Le Floch, 1983), dues à une carence en acide ascorbique. Il se produit chez les personnes qui ne

mangent pas assez de fruits ou de légumes frais, souvent en raison de déséquilibre alimentaire lié à l'âge avancé ou autres (**Fain, 2005**).

Les feuilles de *Moricandia arvensis* sont utilisées dans la cuisine traditionnelle, et une décoction des feuilles et des tiges est utilisée dans le traitement de la syphilis (**Le Floch, 1983**).

d. Travaux antérieurs

Beaucoup de travaux ont été entrepris sur le développement et les conditions environnementales. Un hybride intergénique "Brassicomoricandia" a été obtenu par croisement entre *Moricandia arvensis* (choux des champs) et *Brassica oleracea* (choux fleur) (**Toriyama et al., 1987**).

Braham et al., 2007 ont isolés et caractérisés par les méthodes spectroscopiques des carbohydrates : le β -D-glucopyranosyl-2-méthylbutanoate; 2-O-méthyl- α -D-fructofuranose, 2-O-méthyl- β -D-fructofuranose et le sucrose dans les fleurs fraîches de *M. arvensis*.

Il a été démontré qu'il y a un intermédiaire C₃-C₄ glycine décarboxylase dans la photosynthèse (**Tahir et Watts, 2011**) et ceci est en rapport avec les adaptations biochimiques et anatomiques (**Hunt et al., 1987 ; Rawsthorne et al., 1988a, 1988b**).

D'autres travaux sur les extraits des feuilles et des racines de *M. arvensis* ont montré la protection de cette espèce contre le dommage d'ADN dans les cellules K562 de lymphoblaste humain et l'amélioration de l'activité antioxydante (**Skandrani et al., 2010**).

L'huile essentielle de *M. arvensis* récoltée dans la région de Sétif (Algérie) est riche en 3-butényl isothiocyanate avec un pourcentage de 11,9% et en acide octadécanoïque de l'ordre de 10,3% (**Zeraib et al., 2011**).

III. Présentation de la famille des amaranthacées

Les amaranthacées (chénopodiacées), avec 2 400 espèces répandues surtout dans les zones chaudes et sèches, ont une préférence marquée pour les terrains riches en chlorures ou en nitrates (plantes halophiles ou nitrophiles). C'est ainsi qu'elles poussent en abondance sur les rivages maritimes. De nombreuses espèces croissent également dans les steppes et les déserts. Ce sont des plantes adaptées à la chaleur et à la sécheresse, que celle-ci soit due au climat (zones désertiques) ou qu'elle résulte de la salinité du sol (rivages marins ou sebkha).

Les principales plantes de cette famille sont les chénopodes, les épinards, la betterave et les amarantes.

III.1. Description botanique des chénopodiacées

Du point de vue morphologique, les Chénopodes sont caractérisées par des racines profondes et pénétrantes, destinées à absorber la plus grande quantité d'eau possible, et par des feuilles alternées, petites et farineuses ou recouvertes de poils, lobées, parfois épineuses, formées de manière à réduire les pertes en eau dues à la transpiration. Certains genres ont des tiges pulpeuses, à courts segments internodaux, entièrement dépourvues de feuilles, ce qui donne aux plantes un aspect singulier semblable à celui d'un cactus. Les fleurs, peu visibles et regroupées en inflorescences en épi ou en cyme, sont petites, hermaphrodites ou unisexuées et sont pollinisées par le vent. Les pétales et les sépales, très semblables, sont généralement constitués par cinq, trois ou deux lobes de couleur marron ou verdâtre. Généralement, les anthères, en nombre égal ou à peine inférieur à celui des segments du périanthe, sont disposées au sommet de l'ovaire ou sur un disque (Rosas, 1989).

Le genre *Atriplex* appartient au groupe des plantes en mesure de fixer le CO₂ par biosynthèse C4. De nombreuses recherches ont démontré que ce type de plante est caractérisé par une grande productivité, une résistance au déficit hydrique, une capacité particulière d'utiliser l'énergie lumineuse et un métabolisme qui exige du sodium comme élément essentiel. Pratiquement toutes les espèces appartenant au genre *Atriplex* sont dioïques ; il existe cependant des arbustes monoïques (Mulas, 2004).

a. Présentation de la plante *Atriplex canescens*

Dans sa terminologie originelle (Etats-Unis), il est connu sous le nom de «Forwing saltbush », dans le sens de buisson salé. Son nom arabe est aussi le G'ttaf. Plante originaire du Mexique et du Canada, elle s'est largement propagée en Afrique du nord et au Moyen-Orient. Elle est cultivée dans les étages humides et subhumides, semi arides et arides (H.C.D.S., 1996).

b. Description botanique et systématique de la plante

L'*Atriplex canescens* est un arbuste buissonnant de 1 à 3 m de hauteur, à port plus ou moins étrique, formant des touffes de 1 à 3 m de diamètre. Les rameaux blanchâtres sont étalés, ascendants ou arqués, retombants vers l'extrémité. Les feuilles courtement pétiolées ou sub-sessiles, sont alternes, et leur limbe linéaire, lancéolé et uninervé est vert grisâtre. Il peut atteindre 3 à 5 cm de longueur et 0,3 à 0,5 cm de largeur. Des feuilles axillaires plus petites (0,5 à 1,5 sur 0,1 à 3 cm) sont aussi présentes le long de l'axe feuillé (Benrebiha, 1987) (Figure 4).



Figure 4 : Photo d'*Atriplex canescens* (Nâama, Avril 2012)

Les inflorescences dioïques en épis simples ou panicules sont au sommet des rameaux pour les fleurs mâles et axillaires ou en épis sub-terminaux pour les fleurs femelles. Les graines vêtues de 4 ailes à bords denticulés, ont des dimensions de 10 à 20 mm (**Benrebiha, 1987**).

Cette espèce est classé selon l'APG II (**Dupont et Guignard, 2007**)

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous-classe : Préastéridées

Ordre : Caryophyllales

Famille : Amaranthacées (incl. Chénopodiacées)

Genre : *Atriplex*

Espèce : *Atriplex canescens*

c. Usages thérapeutiques

Certaines espèces d'*Atriplex*, sont largement connues pour leur intérêt médicinal traditionnel, à savoir dans le traitement digestif, respiratoire, uro-génital, vasculaire, et possèdent des propriétés antihypercholestérolémiante, antipyrétique, antirhumatismale (De Feo et Senatore, 1993) et antihyperglycémiant (De Feo et Senatore, 1993 ; kambouche et al., 2011).

d. Travaux antérieurs

Les travaux de kishore et al., 1993 ont montré que les huiles essentielles de cette famille ont un effet fongicide contre les dermatophytes comme *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium trichoides*, d'autres travaux ont également démontré une activité antifongique contre les champignons phytopathogènes (Qasem et Abu-Blan, 1996 ; Mahasneh et al., 1998 ; Peláez et al., 1998 ; Bhosale et al., 1999 ; Boughalleb et al., 2005 ; Ben Sassi et al., 2008 ; Boughalleb et al., 2009).

Gadano et al., (2006) ont déterminé les effets génotoxiques des deux espèces : *Chenopodium ambrosioides* et *Chenopodium multifidum*.

D'autres espèces de chenopodiacées ont été étudiées pour la lutte contre la leishmaniose (Cherif et al., 2012), et pour leur activité insecticide (Nazar et al., 1998 ; Mansour et al., 2004 ; Mohammed et al., 2012).

Benhammou et al., (2009) ont étudiées l'activité antioxydante de différents extraits d'*Atriplex halimus*.

IV. Présentation de la famille des anacardiées

Dans la classification botanique, la famille des anacardiées appelée aussi térébinthacées, constitue une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones. Elle regroupe approximativement 60 genres et 500 espèces, habitant les contrées chaudes et tempérées du globe (Gaston, 1990).

a. Description botanique et systématique de la plante

Schinus molle est un arbre persistant à tronc de 5 à 10 m de hauteur, ramure arrondie, jeunes branches étalées ou pleureuses, jeunes rameaux lisses, à moelle abondante (Figure 5). Les feuilles sont vertes composées paripennées, aromatiques lorsqu'elles sont froissées, de 2 à 6 cm de longueur. Les fleurs sont jaunes verdâtres en panicules lâches. Les fruits pisciformes,

roses abondants et très ornementaux, mesurent environ 8 mm de diamètre (Belot, 1978 ; Becker *et al.*, 1982 ; Somon, 1987).



Figure 5 : Photo de *Schinus molle* (Remchi-Tlemcen, Novembre 2012)

C'est un arbre originaire de l'Amérique du sud, introduit dans la plupart des régions tropicales et subtropicales (Olafsson *et al.*, 1997). Elle est très répandue en Equateur et en Pérou. Elle s'adapte à tous les climats, mais elle se plaît généralement bien sur le littoral méditerranéen (Taylor, 2005).

Cette espèce est classé selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007)

Règne : Végétal
Embranchement : Spermaphytes
Sous-embranchement : Angiospermes
Classe : Eudicots
Sous-classe : Eurosidées II
Ordre : Sapindales
Famille : Anacardiacees
Genre : Schinus
Espèce : *Schinus molle* L.

b. Usages thérapeutiques

Elle est utilisée traditionnellement comme antihémorragique, antiseptique, laxatif (doux), astringent, cardiotonique, stimulant digestif, diurétique, stimulant menstruel, tonifiant et antidépresseur (**Taylor, 2005**).

Les études pharmacologiques menées des extraits de *Schinus molle* ont montré que cette plante exerce plusieurs effets biologiques, tels que : un agent hypotenseur (**Bello et al., 1996**), analgésique (**Barrachina et al., 1997**), antispasmodique (**Bello et al., 1998**), antitumoral (**Ruffa et al., 2002**) et antifongique (**Quiroga et al., 2001 ; Schmourlo et al., 2005**).

c. Travaux antérieurs

Une étude a conduit à l'isolement de trois agents anti-inflammatoires, deux sont des acides triterpénoïdal et une biflavanone (**Yueqin et al., 2003**).

Les huiles essentielles de *Schinus molle* ont fait l'objet de plusieurs travaux décrivant leur composition chimique très variée (**Rossini et al., 1996 ; Baser et al., 1997 ; Ibrahim et al., 2004 ; Marongiu et al., 2004 ; Huaman et al., 2004 ; Hayouni et al., 2008 ; Martins et al., 2014**).

Chapitre 2 : Généralités sur les activités biologiques

I. Activité antioxydante

I.1. Généralités

- **Oxydation et auto oxydation**

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies mais peut être également une source d'agression pour ces organismes (**Namiki, 1990**). Par contre, il est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (**Dalton, 1995**), la détérioration de la qualité des aliments (**Finely et al., 1994 ; Hiramatsu et al., 1994 ; Frankel, 1996**) ainsi que le désordre de la santé humaine qui est relié à l'oxydation des molécules biologiques (**Bermond, 1990 ; Ramarathnam et al., 1995**).

Les substances d'oxydation peuvent avoir différentes structures chimiques que sont les protéines, ADN, acides gras non saturés, cholestérol, phospholipides, et bien d'autres. Les lipides constituent les composés majeurs de notre nutrition, leur étude est donc un sujet très important pour la protection contre l'oxydation puisqu'ils sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires.

- **Les antioxydants**

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des espèces réactives de l'oxygène (**Vansant, 2004**).

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**).

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies mais peut également être une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons ultraviolets, des radiations ionisantes et de métaux de transition (**Ekoumou, 2003**). L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons au cours de la respiration cellulaire des organismes aérobies. Dans l'organisme absorbé au niveau des alvéoles pulmonaires, il est transporté par l'hémoglobine au niveau des organes où il diffuse dans les mitochondries (**Allain, 1996**).

Il assure grâce à des enzymes, l'oxydation de divers substrats endogènes : les phospholipides des membranes cellulaires, les protéines, l'ADN. Cette oxydation conduit à la formation des radicaux libres ou espèces réactives oxygénées (ERO). La formation des ERO

est un processus tout à fait naturel et joue un rôle essentiel dans l'organisme : efficacité de l'apoptose, prolifération cellulaire normale, régulation de la pression sanguine, état redox normal pour l'expression des gènes, etc.. (**Rousseau, 2004**).

Mais ces ERO peuvent causer des dommages à l'organisme, en effet en cas de stress entraînant un défaut de régularisation de l'oxydation, de conditions environnementales ou de déséquilibre alimentaire ils provoquent des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort des cellules (**Rolland, 2004**). Cela peut conduire à l'apparition de nombreuses pathologies telles que les maladies inflammatoires, l'athérosclérose, l'ischémie cérébrale et le cancer (**Diallo et al., 2001**).

Les radicaux libres se définissent comme tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe. Ils sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. Leurs agressions sur l'organisme sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil, d'un effort physique intense.

Les radicaux libres sont :

$O_2^{\cdot -}$ (radical anion superoxyde); OH^{\cdot} (radical hydroxyle) ; HO_2^{\cdot} (radical perhydroxyle) ; RO^{\cdot} (radical alkoyle) ; ROO^{\cdot} (radical peroxyde).

Les espèces à l'origine de radicaux libres sont :

1O_2 (oxygène singulet) ; H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) ; $ROOH$ (hydroperoxyde) (**Cavin, 1999 ; Rolland, 2004**).

L'organisme limite l'extension des réactions radicalaires par un système important de défense constitué par les antioxydants susceptibles de piéger les radicaux libres sous une forme peu réactive (**Allain, 1996**).

I.2. Mécanismes de l'oxydation

Les radicaux libres sont formés au niveau de divers organites cellulaires : les mitochondries, les microsomes, le cytosol à travers plusieurs enzymes (la xanthine oxydase) (**Allain, 1996**).

Traditionnellement, on décrit l'oxydation en trois phases distinctes, mais pratiquement simultanées : une phase d'initiation avec formation d'hydroperoxydes ; une 2^{ème} phase de propagation : destruction des hydroperoxydes ; et une dernière phase de terminaison : apparition de nouvelles molécules anarchiques. La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique (**Rolland, 2004**).

I.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Un antioxydant peut agir de diverses manières (Coene, 2004) :

- Il peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci et en le préservant ainsi de l'oxydation.
- Il peut arrêter la réaction en chaîne qui préside à la multiplication des radicaux libres, le plus souvent parce que la structure des antioxydants est relativement stable.
- Il peut absorber l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur.
- Il peut aussi agir via chélation avec des métaux, ce qui a pour effet de ralentir les réactions de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer ferreux avec le peroxyde d'hydrogène selon une réaction d'oxydo-réduction).

I.4. Sources d'antioxydants

Nous avons principalement trois sources d'antioxydants :

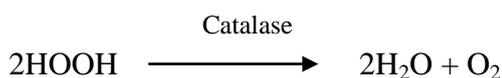
La première est endogène et se compose de protéines, d'oligoéléments et d'enzymes qui constituent la première ligne de défense en participant à la neutralisation excédentaire en radicaux libres (Coene, 2004) :

- La S.O.D (superoxyde dismutase) cytoplasmique extracellulaire et mitochondriale, elle contient du zinc, du cuivre et du manganèse. Elle transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui se transforme en O₂ et en eau par catalase.



- Le glutathion-peroxydase ou GPx présent dans les mitochondries, renferme du sélénium et détruit les peroxydases lipidiques.

- La catalase présente dans les hématies détruit l'eau oxygénée et évite ainsi la formation de radicaux OH[·].



- La ferritine, la transferrine, l'albumine qui par liaison aux métaux leur font perdre partiellement ou totalement leur activité de stimulation des réactions radicalaires. Les métallothioéines, protéines qui fixent les métaux jouent un rôle protecteur contre la toxicité des radicaux libres (Traoré, 2005).

La deuxième source est notre alimentation, au sein de ce groupe nous pouvons encore établir une distinction entre les nutriments classiques (peptides et acides aminés, vitamines E et C et les composants bioactifs (flavonoïdes, caroténoïdes).

- Vitamine C : c'est un antioxydant puissant. Elle travaille avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour arrêter des radicaux. Elle est largement présente dans les fruits et légumes frais (citron, orange, légumes à feuilles vertes). Elle est instable à la chaleur et à la lumière UV. Le surdosage en vitamine C peut provoquer un risque accru de formation de calculs rénaux, d'hémolyses des globules rouges.

- Vitamine E ou alpha tocophérol : Elle protège les acides gras insaturés au niveau des membranes cellulaires. Il réagit avec un radical d'acide gras avant que ce dernier puisse réagir avec un nouvel acide gras et déclencher une réaction en chaîne oxydante. Elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers et sur le vieillissement. Elle limiterait les effets néfastes du cholestérol et donc préviendrait de l'athérosclérose. Elle est essentiellement présente dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines. Les fruits, les légumes et la viande contiennent également une petite quantité de vitamine E.

- Les caroténoïdes : Bêta-carotène, est un précurseur de la vitamine A (rétinol) et se trouve principalement dans les légumes et les fruits (carotte, poivron). Il possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Nous avons également l'alpha carotène (mangue), la lutéine (épinards), le lycopène (tomates).

- Les polyphénols

Les polyphénols doivent leur activité à, comme leur nom, l'indique, un très grand nombre de résidus hydroxyles, qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne (**Rolland, 2004**).

Propriétés réductrices des polyphénols :

➤ Flavonoïdes : Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (**Nkhili, 2009**).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C (**Figure 6**).

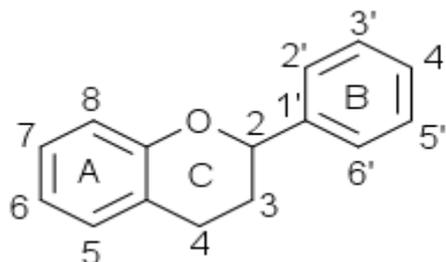


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes

Ils agiraient sur la réduction de l'acide déhydroascorbique *via* le glutathion à l'encontre duquel ils se comporteraient comme des donneurs d'hydrogène. Plus généralement, les flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres. Ils réagissent avec ces derniers, empêchant les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaires. Cette capacité antioxydante serait liée à l'affinité pour les radicaux et donc à la structure du flavonoïde : la présence de 2 hydroxyles en *ortho* sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 *via* la double liaison en 2,3 sont des éléments favorables. Plusieurs flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la lipooxygénase et/ou de la cyclooxygénase, ce qui pourrait être en relation directe avec leur capacité à piéger les radicaux libres. Ces propriétés démontrées *in vitro* pourraient expliquer, dans la plupart des cas, les activités anti-inflammatoires et antiallergiques reconnues par de nombreux auteurs à plusieurs drogues connues pour renfermer les flavonoïdes (**Bruneton, 1993**).

- Tanins : ils inhibent la peroxydation lipidique, ce sont des piègeurs de radicaux libres, des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (**Bruneton, 1993**). Toutes les plantes en contiennent à un degré plus ou moins élevé. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).
- Acides phénoliques : Ce sont des dérivés de l'acide hydroxycinnamique, plus exactement des dérivés des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et chlorogénique. Ils

possèdent des activités antioxydantes et antiradicalaires. De nombreux glycosides du phénylpropane ont montré de fortes activités antioxydantes (**Cavin, 1999**).

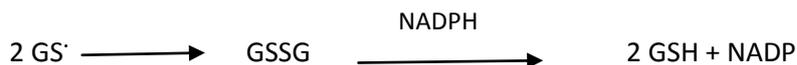
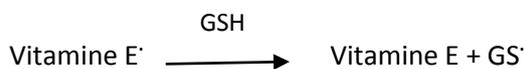
- Xanthones : Manguiférine : elle agit par inhibition envers la peroxydation des lipides, elle possède également des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions superoxydes.

- Coumarines : ils possèdent les propriétés de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxydes, superoxydes et peroxydes.

- Lignanes : les lignanes diaryl furanofuraniques tels que le sésamol ont démontré des propriétés antioxydantes expliquant ainsi la stabilité de l'huile de sésame (*Sesamum indicum* DC., Pedaliaceae) (**Bathily, 2002**).

- Les quinones, en particulier le coenzyme Q ou ubiquinone, et la bilirubine qui est le produit final de la dégradation du métabolisme de l'hème ont aussi un effet antioxydant (**Allain, 1996**).

- Le glutathion : tout antioxydant peut devenir à tout moment un agent prooxydant s'il n'est pas régénéré rapidement sous sa forme initiale. Ainsi le glutathion joue un rôle unique et essentiel dans le maintien des propriétés antioxydantes de différents antioxydants (**Coene, 2004**).



- Sélénium, cuivre, zinc : ce sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes. Ils se trouvent dans les œufs, le fromage, la levure alimentaire, les céréales complètes, les fruits oléagineux, les graines, les haricots et les légumes.

Une augmentation des concentrations plasmatiques ou érythrocytaires de sélénium s'observe au cours de diverses maladies neurologiques, cardiovasculaires et dans divers cancers.

La troisième source est constituée par les médicaments :

Plusieurs agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens les antihyperlipoprotéiniques, les bêta-bloquants et les antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (**Cavin, 1999**).

II. Activité antimicrobienne

II.1. Généralités

La résistance aux antibiotiques est devenue un grave problème de santé public touchant la quasi-totalité des agents antibactériens dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques perdent de leur efficacité et les maladies que l'on croyait éradiquées réapparaissent. La diminution de l'efficacité des moyens de lutte oblige de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides (**Alami et al., 2005**). Les plantes possèdent un système de défense naturel très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, à titre d'exemples de molécules antimicrobiennes contenus dans les plantes, nous citerons les huiles essentielles et les extraits qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies, et pour améliorer la santé et le bien être (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008**).

II.2. Mécanismes d'action et de résistance des agents antimicrobiens

Les agents antibactériens sont classés selon leurs cibles bactériennes. Il s'agit de cinq mécanismes (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**) : Le blocage de la synthèse de la paroi bactérienne ; l'inhibition de la synthèse des protéines ; l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques ; l'altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique ; une inhibition de la synthèse de divers métabolites.

Les antibiotiques ont été très efficaces pour le traitement de nombreuses maladies qui étaient un fléau pour le genre humain. Ils ont été qualifiés de « médicaments miracles ».

Après plus de 50 ans d'utilisation massive des antibiotiques, nous arrivons maintenant à une période plus délicate. Le monde bactérien est capable de s'adapter à une nouvelle situation écologique, y compris à la présence des antibiotiques. En développant des stratégies de résistance vis-à-vis des molécules d'antibiotiques, les bactéries reprennent l'avantage. En effet, l'emploi intensif des antibiotiques, tant en médecine humaine que vétérinaire, mais aussi pour des usages phytosanitaires, est directement relié à l'augmentation des résistances et à la perte d'intérêt d'un grand nombre de molécules (**Alami et al., 2005**).

➤ Mécanismes génétiques

Au plan génétique, la résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**).

La résistance acquise affecte seulement quelques souches d'espèces naturellement sensibles, à la suite d'évènements génétiques variés : mutations chromosomiques ou acquisition de gènes. Il peut s'agir d'une mutation qui peut entraîner, par exemple une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration. Pour les gènes acquis, le plus souvent, il s'agit de l'acquisition d'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes. L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison. Elle se fait par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistance (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999 ; Chevalier et al., 2003**).

➤ Mécanismes biochimiques

Les trois mécanismes biochimiques principaux de la résistance aux antibiotiques sont le défaut d'accumulation, la détoxification enzymatique de l'antibiotique et l'absence de cible ou d'affinité de(s) cible(s). Ces mécanismes biochimiques sont effecteurs aussi bien des résistances naturelles que des résistances acquises. La résistance acquise par mutation chromosomique est souvent associée à une diminution de l'accumulation de l'antibiotique ou à une altération des cibles, alors que la résistance par acquisition de gènes est généralement liée à la production d'enzymes inactivantes (**Chevalier et al., 2003**).

Par ailleurs, de nombreuses questions se posent à l'heure actuelle sur la toxicité des substances synthétiques. Or ces produits non seulement enravent l'infection mais affaiblissent en même temps l'organisme qui par la suite aura des difficultés à recréer son propre système de défense. De plus, la prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents antimicrobiens a entraîné la sélection de souches multi-résistantes comme celles du milieu hospitalier responsables de syndromes infectieux graves (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**).

Chapitre 3 : Techniques d'analyse des huiles essentielles

La valorisation de ces composés naturels passe nécessairement par une étape de caractérisation qui est l'analyse chimique. En effet, la détermination de la composition chimique a intéressée de nombreux chercheurs et les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées. Ainsi, il existe plusieurs techniques chromatographiques (CCM, CPG, CLHP) permettant d'individualiser les constituants et plusieurs techniques spectroscopiques (SM, RMN ¹³C) qui permettent de les identifier.

1. Identification des constituants d'un mélange complexe :

D'une façon générale, l'analyse d'un mélange complexe peut être effectuée selon deux voies A et B schématisées sur la **figure 7**.

- La voie A met en œuvre le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques, permettant d'individualiser les constituants et d'une ou plusieurs techniques spectroscopiques qui permettent de les identifier. Cette voie s'avère être bien adaptée aux analyses de routine où l'identification des constituants ne présentant pas de difficultés majeures (huiles essentielles déjà étudiées, contrôle de qualité, ...).

- La voie B requiert, dans un premier temps, la purification des constituants du mélange même lorsque ceux-ci sont présents en faible quantité. Dans un deuxième temps, ces composés sont identifiés à l'aide de diverses techniques spectroscopiques.

- Une autre approche, la voie C, peut être envisagée. Elle utilise la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du carbone-13 comme technique d'identification des constituants d'un mélange complexe, sans séparation préalable ou éventuellement après une étape de séparation aussi réduite que possible. De plus, cette technique peut être utilisée pour la quantification des composés difficilement quantifiables avec les techniques habituelles.

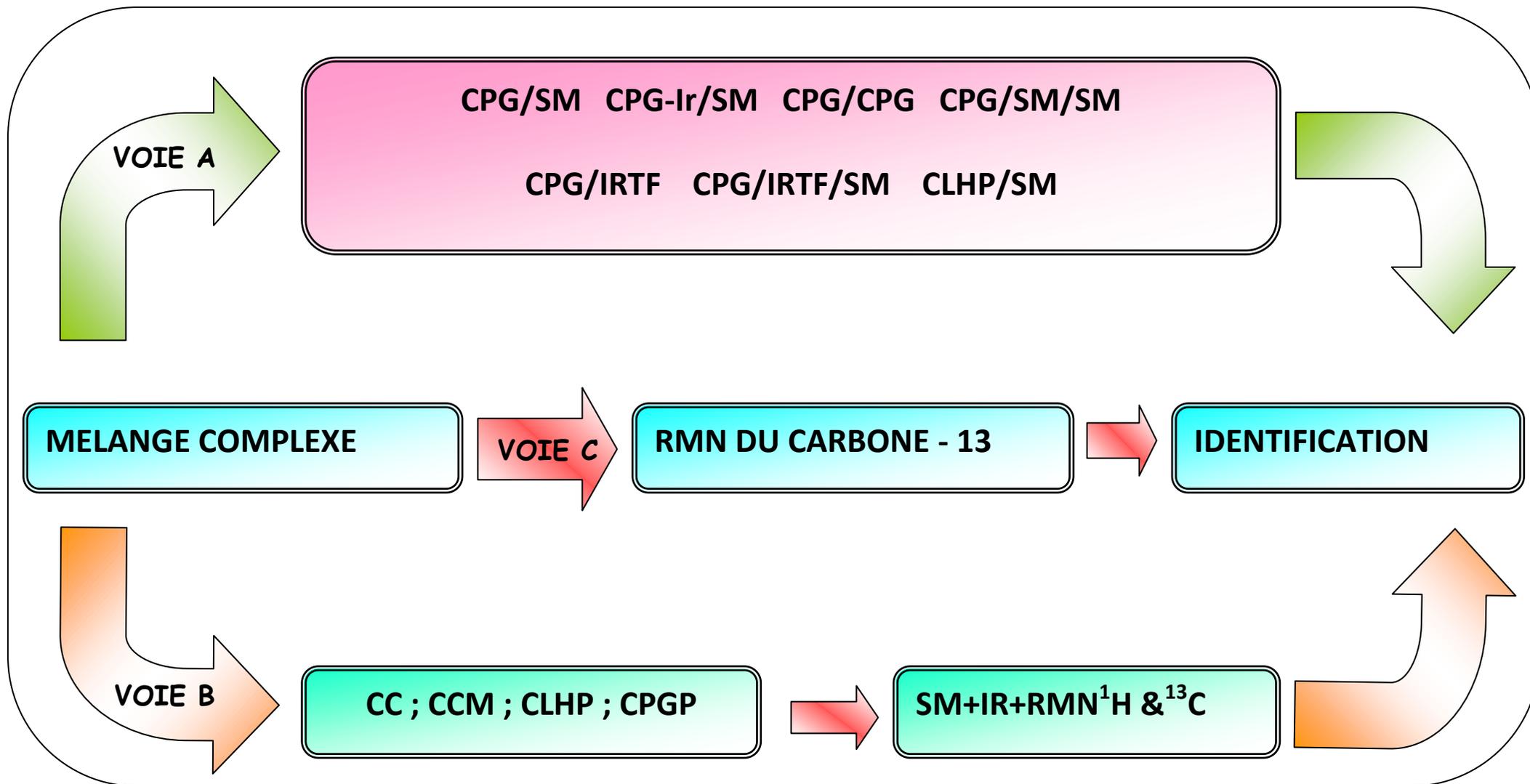


Figure 7 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe

I.1. Méthodes d'analyses par couplage (chromatographie- spectroscopie) : Voie A

On attribue la découverte de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage (**Martin et Synge, 1941 ; Arpino et al., 1995**).

C'est une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Elle repose sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou aux dérivés de substances, qui se volatilisent dans des conditions de températures utilisées (**Pharmacopée Européenne, 2002**). L'identification d'une substance peut donc être facilitée par la connaissance de son temps de rétention. Les indices de rétention, plus fiables que les temps de rétention, sont privilégiés dans le cas d'analyse des huiles essentielles. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante (Indice de Kovats, IK) ou en programmation de température (Indices de rétention, IR) (**Kováts, 1965**). Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent co-éluer et présentent fortuitement des indices de rétention identiques.

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés notamment les divers couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques tel que le couplage CPG-SM ; le couplage CPG-SM-SM ; le couplage CPG-IRTF ; le couplage CPG-CPG et le couplage CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) avec une technique spectroscopique qui permettent d'obtenir un spectre de la molécule et rendent possible la comparaison avec ceux des molécules de référence.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG-SM) en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée et elle est particulièrement intéressante pour l'identification des substances naturelles. Elle permet d'obtenir le spectre de masse de molécules séparées par la CPG et de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

Les spectres de masse, ainsi obtenus, sont ensuite comparés à ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles commerciales ou

élaborées au laboratoire (Adams, 1989 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Joulain et König, 1998 ; National Institute of Standards and Technology, 1999).

La mise au point d'un logiciel informatique qui tient compte simultanément des indices de rétention et des spectres de masse des composés, développé par Vernin *et al.* en 1986 et en 1988, a facilité l'identification des constituants de nombreuses huiles essentielles.

I.2. Identification des constituants après purification : Voie B

L'identification de certains composés peut poser problème malgré l'utilisation de ces différentes techniques d'analyses complémentaires. En effet, certains constituants du mélange peuvent être absents des bibliothèques de spectres commerciales ou construites au laboratoire. Ils doivent être isolés afin d'être identifiés par diverses méthodes spectroscopiques. Ces constituants peuvent être purifiés en utilisant différentes techniques chromatographiques comme la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP ou la chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP). Après un degré de purification acceptable (supérieur à 95%), l'identification est ensuite effectuée par l'utilisation de plusieurs techniques spectroscopiques telles que l'ultra-violet (UV), l'infrarouge, la spectrométrie de masse, la RMN du proton et du carbone-13.

Bien que la purification suivie de l'identification de chaque constituant du mélange rend cette voie B longue à mettre en œuvre, celle-ci se révèle être particulièrement fiable et adaptée pour l'étude des huiles essentielles de composition chimique complexe.

I.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable : Voie C

Une troisième voie (Voie C), intermédiaire par rapport aux précédentes voies A et B, est basée sur l'étude du spectre de RMN du carbone-13 du mélange, sans séparation préalable pour l'identification et parfois pour la quantification des principaux constituants de mélanges naturels. Cette technique a été développée au laboratoire et a fait l'objet de divers travaux depuis le début des années 1990.

Au début, la RMN servait à confirmer des molécules majoritaires proposées par CPG-IK ou par la CPG-SM. Dans ce contexte, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point et développé, depuis les années 90, une méthode d'analyse des mélanges complexes naturels basée sur la RMN du carbone-13, efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996).

- Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles.

- La RMN étant une technique non-destructive, l'échantillon peut être récupéré et éventuellement soumis à d'autres analyses.

L'identification des constituants d'un mélange par RMN du carbone-13 est basée sur la comparaison des déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés. Il est donc nécessaire que l'enregistrement du spectre du mélange et des spectres des composés de référence soit réalisé avec des conditions expérimentales optimisées et standardisées afin d'éviter des variations importantes de déplacement chimique.

➤ **Attribution des signaux**

Les déplacements chimiques des noyaux de carbone-13 subissent l'effet de l'environnement électronique des noyaux voisins. Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui lui sont propres et constituera son spectre.

Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structure différente présentent des spectres de RMN du ^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés, dans la mesure où la moindre modification structurale s'accompagne de variations, plus ou moins importantes mais généralement mesurables, des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones de la molécule.

Il est donc possible d'identifier un composé en comparant ses déplacements chimiques avec ceux de produits de référence. Il va sans dire que des résultats plus précis seront obtenus quand les spectres des composés de référence sont enregistrés au laboratoire avec les mêmes conditions analytiques (température, solvant, concentration, appareillage, ...) que celles du mélange inconnu, plutôt qu'en utilisant les données de la littérature (surtout si elles ne sont pas récentes).

➤ **La méthode d'analyse développée au laboratoire par l'équipe « Chimie et Biomasse » :**

Depuis plusieurs années, l'équipe « Chimie et Biomasse » en Corse utilise la RMN du carbone-13 comme outil d'analyse des mélanges complexes. Cette méthode a pour but l'identification et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans une étape préalable de purification.

Elle est basée sur la comparaison des déplacements chimiques présents dans le spectre du mélange complexe avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (**Figure 8**). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges sont réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (concentration, nature du solvant, paramètres d'enregistrement des spectres). Un logiciel d'aide à l'identification a été mis au point et développé au laboratoire, il tient compte de plusieurs paramètres :

- Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- Le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones de deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou quand les composés présents ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;
- Les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence.

De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode d'analyse, qui allie rapidité et fiabilité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B.

Avec l'expérience acquise par cette équipe notamment dans le domaine des huiles essentielles. Différentes bibliothèques de spectre de composés de référence appartenant à différentes familles ont été créées. Ces banques sont continuellement enrichies avec des spectres de produits isolés des mélanges naturels ou encore préparés par hémisynthèse.

A l'heure actuelle, la banque la plus importante enregistrée au laboratoire est celle des terpènes (mono-, sesqui- et diterpènes). Elle contient les données de plus d'un millier de molécules. Par ailleurs, d'autres bibliothèques élaborées à partir de données de la littérature récente ont été conçues. Ces données concernent d'une part les sesquiterpènes et les diterpènes et d'autre part les triterpènes, les sucres les lipides et les phénols.

Les composés volatils identifiés à partir du spectre de RMN du carbone-13, sont ensuite repérés sur le chromatogramme du mélange par comparaison de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire avec ceux des produits de référence, permettant ainsi de les quantifier. Dans le cas de molécules non volatiles ou thermosensibles, la quantification peut être réalisée par RMN (**Castola et al., 1999 ; Castola et al., 2000 ; Baldovini et al., 2001 ; Rezzi et al., 2002 ; Rezzi et al., 2005**).

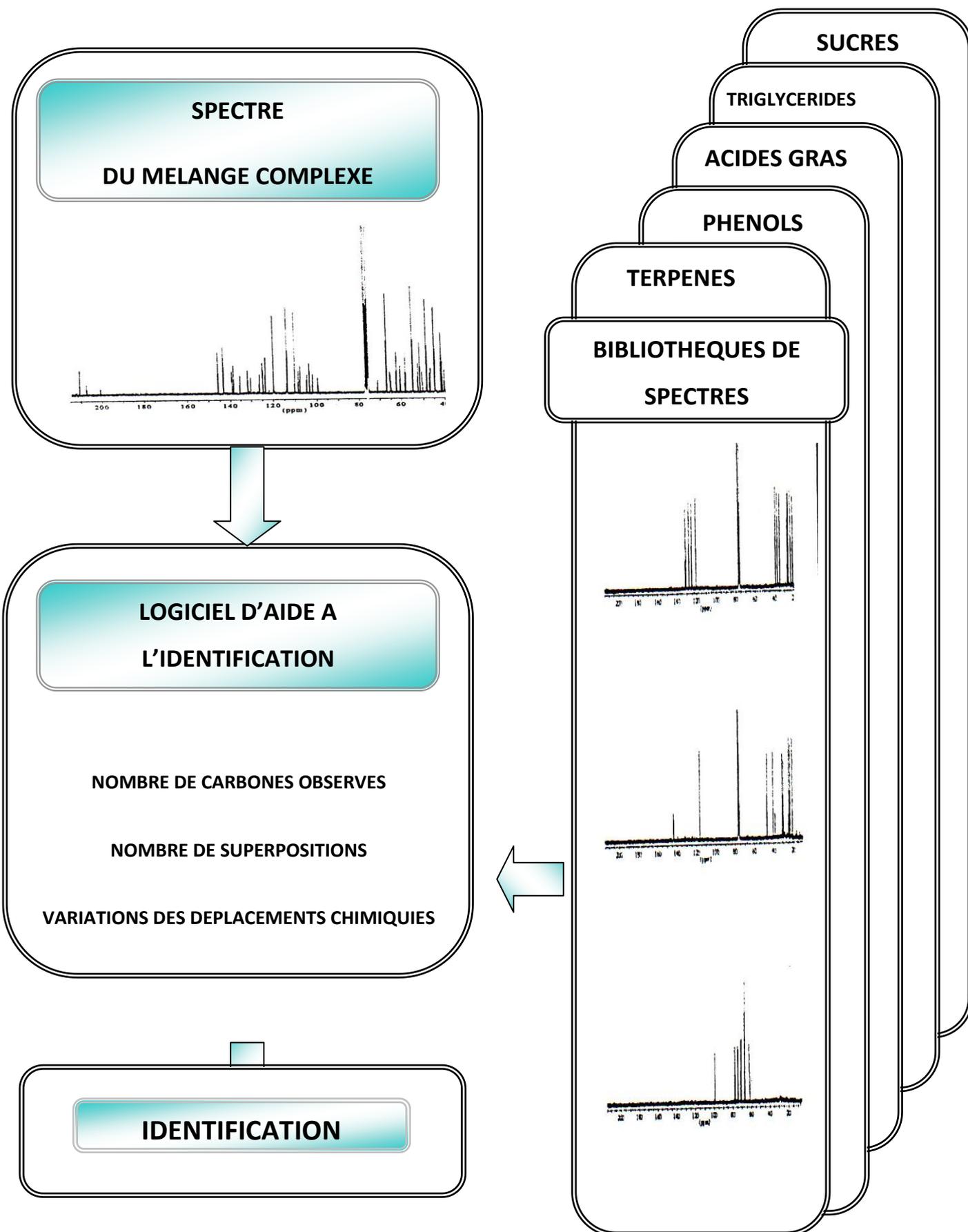


Figure 8 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13

2^{ème} partie : Matériel et méthodes

Chapitre 1 : Screening phytochimique, extraction des composés phénoliques et leurs teneurs

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles de la région de l'Ouest algérien, et plus particulièrement les plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à cinq espèces à savoir : *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*. Pour cela, il est important de définir leurs identités, connaître leur composition chimique, et rechercher leurs activités biologiques.

I. Origine géographique et période de récolte du matériel végétal

Les cinq espèces végétales étudiées proviennent de la région Ouest de l'Algérie (**Tableau 1, figure 12**).

Tableau 1. Situation géographique des stations de récolte

Plantes	Région	Période de récolte	Parties étudiées	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)	Etage bioclimatique
<i>Nepeta nepetella</i>	Aïn Sefra (Nâama)	Mai 2012	Tiges, feuilles et fleurs	32° 45'	0° 34'	Semi-aride
<i>Mentha rotundifolia</i>	Lala Setti (Tlemcen)	Mars 2013	Tiges et feuilles	34° 85'	1° 40'	Semi-aride tempéré
<i>Moricandia arvensis</i>	Aïn Sefra (Nâama)	Mai 2013	Tiges et feuilles	32° 45'	0° 34'	Semi-aride
<i>Atriplex canescens</i>	Nâama	Avril 2012	Tiges et feuilles	34° 40'	0° 30'	Semi-aride
<i>Schinus molle</i>	Remchi (Tlemcen)	Novembre 2012	Feuilles et fruits	35° 43'	1° 26'	Semi-aride tempéré

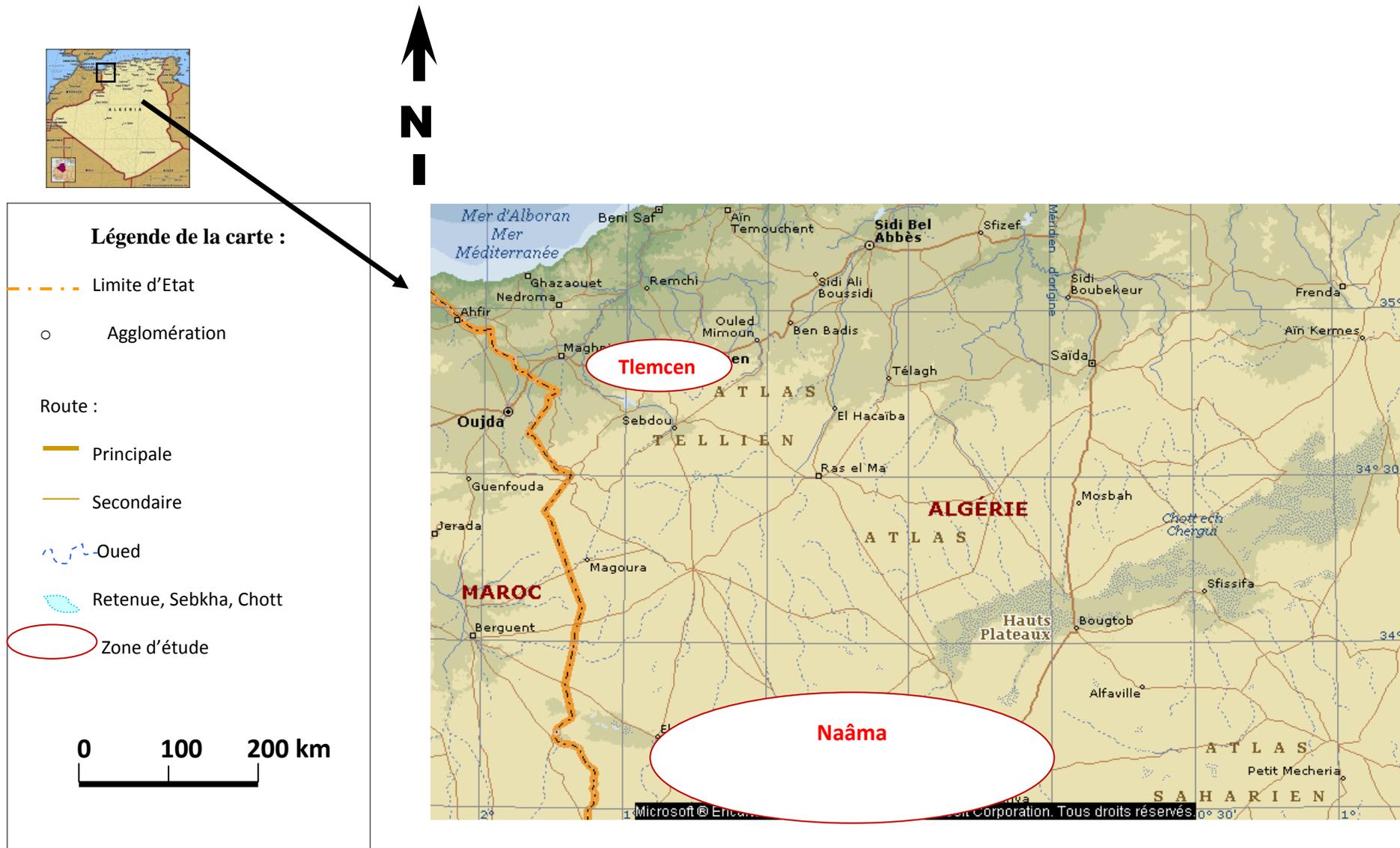


Figure 12 : Situation géographique des stations d'étude (Encarta, 2006)

I.1. Identification botanique

Les cinq espèces ont été identifiées par le Professeur BENABADJI N. membre du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen (Algérie).

I.2. Préparation des échantillons

Le matériel végétal récolté et trié est séché à l'air libre, à l'ombre et à la température ambiante pendant six jours, puis broyées au mortier.

Ces poudres sont ensuite conservées dans des flacons, en verre hermétiquement fermés à basse température -18°C en vue de procéder aux différentes manipulations.

II. Tests phytochimiques

L'examen phytochimique est utilisé essentiellement afin de détecter les différentes classes de composés chimiques existantes dans la plante. Ceci constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal broyé est mis en présence de 300 ml d'eau. Puis l'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Après filtration, l'extrait aqueux est soumis aux différents tests cités ci-dessous (**Annexe A**).

II.1.1. Amidon

L'amidon se comporte comme une substance de réserve principale des végétaux. Il existe sous forme d'une structure qui correspond à un homopolymère de D-glucose. Il est caractérisé au moyen du réactif à l'eau iodée par apparition d'une couleur bleue (**Guignard, 1979**). La détection consiste à :

- Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturé dans un bain marie jusqu'à ébullition ;
- Ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

II.1.2. Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse (**Bruneton, 1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant 1 ml d'eau distillée à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est agitée fortement pendant 1 min. Le mélange est ensuite abandonné pendant 20 min puis la teneur en saponosides est évaluée. La présence des saponosides est confirmée par la mesure de la hauteur de la mousse :

- S'il n'y a pas de mousse, le test est dit négatif (-)
- Si la mousse est de 1 cm d'épaisseur, le test est faiblement positif (+)
- Si la mousse est entre 1 et 2 cm, le test est positif (++)
- Si la mousse est supérieure à 2 cm, le test est fortement positif (+++)

II.1.3. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml d'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. L'apparition d'une couleur verte foncée ou bleu-verte indique la présence de tanins (**Trease et Evans, 1987**).

II.1.4. Les anthraquinones

La détection des anthraquinones consiste à : (**Bruneton, 1999**)

- Traiter 1 g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5 M) et 1 ml H_2O_2 dilué à 5% ;
- Bouillir et refroidir le mélange ;
- Filtrer, puis acidifier le filtrat avec de l'acide acétique ;
- Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de toluène ;
- Agiter l'extrait de toluène en présence de 5 ml de NH_4OH .

Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal broyé est mis en présence de 300 ml d'éthanol. Puis l'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Après filtration, l'extrait éthanolique est soumis aux tests cités ci-dessous (**Annexe B**).

II.2.1. Flavonoïdes

Traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. L'apparition d'une couleur rose ou rouge qui se développe après 3 minutes indique la présence des flavonoïdes (**Bruneton, 1993**).

II.2.2. Alcaloïdes sels

Leur détection consiste à : (**Memelink et al., 2001**)

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique ;
- Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH (10%) jusqu'au pH 9 ;
- Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec ;
- Dissoudre le résidu dans du HCl (2%) ;
- Tester la présence des alcaloïdes par les réactifs de Mayer et de Wagner afin d'obtenir un précipité blanc et un précipité brun respectivement indiquant leur présence.

II.2.3. Les tanins

Ajouter 1 ml de l'extrait éthanolique ; 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un test positif est révélé par (**Trease et Evans, 1987**).

- L'apparition d'une coloration bleu-verte indique la présence des tanins catéchiques.
- L'apparition de la coloration bleu-noir indique la présence des tanins galliques.

II.2.4. Anthracénosides, coumarines et anthocyanosides

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- Ajouter 15 ml d'HCl (10%) à 25 ml de l'extrait éthanolique ;
- Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes ;

- Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther diéthylique.

Ensuite, chacune de ces familles est détectée séparément :

a. Les anthracénosides

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Bornträger, en traitant 8 ml de la solution extractive éthanolique par ce dernier. L'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée-rouge au violet-pourpre indique la présence des anthracénosides (**Bruneton, 1999**).

b. Les coumarines

5 ml de la solution extractive étherique est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans 2 ml d'eau chaude, un volume de cette phase aqueuse est additionné avec 0,5 ml d'une solution d'ammoniaque NH_4OH à 10% et un autre volume est gardé comme un témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV indique la présence de coumarines (**Bruneton, 1999**).

c. Les anthocyanosides

Leur détection consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH, (**Bruneton, 1999**). Elles ont des colorations variant en fonction du pH, le virage de couleur confirme la présence des anthocyanosides de façon que :

- $\text{pH} < 3$, la solution prend une coloration rouge ;
- $4 < \text{pH} < 6$, la solution prend une coloration bleue.

II. 2.5. Stérols et stéroïdes

Deux essais ont été effectués : (**Linden et al., 1994**)

Essai 01 : Il consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml d'extrait éthanolique ;
- Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer ;
- Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique ;
- Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ;

- Agiter, et après laisser la solution reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C).

Essai 02 : Il consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml d'extrait éthanolique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, puis filtrer ;
- Traiter le filtrat par la réaction de Libermann-Burchardt.

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement.

II. 2.6. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

II.3. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal broyé est mis en présence de 300 ml d'éther diéthylique. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux tests cités ci-dessous (**Annexe C**).

II.3.1. Les huiles volatiles

La détection des huiles volatiles consiste à : (**Harborne, 1973**)

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans l'alcool ;
- Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

II. 3.2. Acides gras

L'essai effectué consiste à : (**Harborne, 1973**)

- Concentrer à sec 20 ml de la solution étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse ;
- Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique ;
- Concentrer à sec la solution étherée.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

II. 3.3. Les alcaloïdes bases

La détection des alcaloïdes consiste à : (**Memelink et al., 2001**)

- Evaporer à sec 10 ml de l'extrait étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml d'HCl (2%) ;
- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

❖ Réactifs et réactions de caractérisation

- **Réactif d'amidon** : dissoudre 1,2 g d'iode (I_2) dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure potassium (KI) puis chauffer pendant 5 minutes et diluer jusqu'à 250 ml ou 500 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g I_2 dans 75 ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée.
- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358 g de $HgCl_2$ dans 60 ml d'eau distillée. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml par de l'eau distillée.
- **Réaction de liqueur de Fehling** : Mélanger 5 ml de liqueur Fehling A avec 5 ml de liqueur Fehling B. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétooses donne un précipité rouge brique.

➤ **Réaction de Libermann-Burchardt** : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer la solution 30 minutes à 21 °C.

➤ **Réaction de Bornträger** : En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

III. Extractions sélectives et dosages

La mise en évidence des différentes familles de composés dans les différentes parties étudiées, nous a permis de cibler quelques familles prépondérantes puis les extraire, par la suite nous avons procédé à l'analyse des extraits par des méthodes chromatographiques et des dosages spectrophotométriques.

III.1. Extraction des composés phénoliques

III.1.1. Préparation des extraits bruts secs

a. Préparation de l'extrait aqueux

10 g de poudre de la plante a été porté à reflux pendant 2 heures dans 150 ml d'eau distillée, puis filtrés ; ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65 °C au Rotavapor (Büchi R-200). Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement (Majhenic et al., 2007).

b. Préparation de l'extrait méthanolique

Une prise d'essai de 2,5 g de poudre de la plante a été mise à macérer dans 25 ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30 minutes.

L'extrait a ensuite été stocké à 4 °C durant 24 heures, filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50 °C au Rotavapor. Le résidu sec pesé est repris par 3 ml du méthanol et conservé à -18 °C (Falleh et al., 2008).

III.2. Dosage des phénols totaux

Le réactif utilisé est celui de « Folin-Ciocalteu » ; c'est un mélange complexe des acides phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de couleur jaune.

Le principe de ce dosage en utilisant la méthode de **Singleton et Rossi, 1965** est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 765 nm.

Une quantité de 200 µl des extraits de chaque partie de la plante est mélangé avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7,5%. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax+b$) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS) en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'acide gallique/g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait méthanolique ou aqueux

m : Prise d'essai de la matière sèche (g)

III.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm.

Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique convenablement dilué est mélangé avec 1500 µl de l'eau distillée. A temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5% est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% (m/v) est rajouté. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre le blanc.

La teneur en flavonoïdes totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage ($y=ax+b$) réalisée par la catéchine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents catéchine par gramme du poids de la matière sèche (mg EC/g MS).

III.4. Extraction des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes

Pour dissoudre les flavonoïdes, nous avons soumis nos extraits secs méthanoliques à un fractionnement à l'acétate d'éthyle et n-butanol selon le protocole décrit par **Bekkara et al., (1998)**.

Les résidus secs obtenus après évaporation du filtrat méthanolique des plantes ont été repris dans 20 ml d'eau bouillante et extrait dans une ampoule à décanter successivement avec 2 x 20 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) et butanol (n-BuOH). Les deux fractions de chaque phase organique ont été concentrées au rotavapor. Les résidus secs ont été repris dans 3 ml de méthanol puis conservé à -18°C. Ces derniers étant la fraction acétate d'éthyle et la fraction n-butanol respectivement (**Annexe D**).

III.5. Extraction des tanins

III.5.1. Protocole d'extraction

L'extraction des tanins a été effectuée selon la méthode adaptée par **Zhang et al.** en **2008**.

➤ 2,5 g de poudre de matériel végétal a été extraite par 50 ml du mélange acétone/eau distillée (35/15, V/V) durant trois jours à une température ambiante.

➤ La solution est filtrée puis évaporée par un Rotavapor de type Büchi R-200 pour éliminer l'acétone. Ensuite, la phase aqueuse est lavée par 15 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle.

➤ Le mélange des deux phases est évaporé à sec à 40 °C puis pesé et repris par 3 ml de méthanol.

III.6. Dosage des tanins condensés

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**).

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tanins est estimée en milligramme (mg) équivalents catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC)/g MS) à partir de la courbe d'étalonnage.

III.7. Calcul du rendement

Le pourcentage en extraits bruts sec méthanolique et aqueux ainsi que celui des différentes fractions a été calculé par la formule suivante :

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

R(%) : Rendement exprimé en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

Chapitre 2 : Extraction et caractérisation des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* et *Schinus molle*

I. Extraction des huiles essentielles

De part la volatilité des composés considérés, l'extraction, souvent délicate, est l'étape cruciale. L'entraînement à la vapeur d'eau est une méthode traditionnelle simple et assez efficace. La plante est placée, sur une grille, au-dessus de l'eau puis chauffée. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur jusqu'à un réfrigérant. Après condensation, une phase organique (insoluble dans l'eau) est récupérée : l'huile essentielle (Augusto et al., 2003).

Toutefois, ce chauffage assez conséquent, 100 °C en milieu aqueux, peut provoquer des modifications chimiques ; ce qui aboutit à la formation de nouvelles substances (réarrangements ou destruction de certaines molécules).

Technique d'extraction : Entraînement à la vapeur d'eau

Le montage utilisé est constitué d'un ballon métallique contenant 5 litres d'eau, posé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte contenant le matériel végétal placé sur une grille (Annexe E). L'enceinte est reliée à son tour à des réfrigérants qui condensent les vapeurs que l'on recueille sous forme de distillat dans une fiole à décanter. Cette phase est séchée sur du sulfate de magnésium. L'échantillon d'huile essentielle obtenu est conservé à -18 °C jusqu'à analyse.

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule ci-dessous (Carré, 1953).

$$R (\%) = (m / m_0) \times 100$$

R (%) : Rendement en huile essentielle exprimé en %.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

m₀ : Masse en grammes du matériel végétal sec à traiter.

II. Analyses des huiles essentielles

Les huiles essentielles des trois espèces végétales ont été réalisées au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse-CNRS au moyen des méthodes : chromatographie en phase gazeuse indices de rétention sur des colonnes de polarités différentes (CPG-Ir), par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN ¹³C) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

II.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

★ Conditions opératoires :

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer Clarus 500, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires de dimensions 50 m x 0,22 mm (épaisseur du film : 0,25 µm) :

- ✓ Une colonne polaire BP-20, polyéthylène glycol ;
- ✓ Une colonne apolaire BP-1, polyméthylsiloxane.
- Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 ml/min), avec une pression en tête de colonne de 20 psi
- La température de l'injecteur est de 250 °C, celle du détecteur est de 250 °C
- La température linéaire est programmée depuis 60 °C jusqu'à 220 °C, à raison de 2 °C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220 °C
- Injection automatique : 0,1 µl en mode Split (1/60).

★ Identification des constituants

Les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane (C_8 - C_{28}) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire (Joulain et König, 1998).

II.2. Spectrométrie de Masse (SM)

★ Conditions opératoires

Les huiles essentielles sont analysés à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue, de dimension 60 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 µm), Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane), couplé à un détecteur de masse Perkin-Elmer TURBOMASS. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 150 °C par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

- Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi.
- La température linéaire est programmée depuis 60 °C jusqu'à 230 °C, à raison de 2 °C/min, suivie d'un palier de 45 min à 230 °C
- Spectre de masse à ionisation électrique obtenu au-dessus d'un intervalle de 35-350 Da.
- Injection automatique : 0,2 µl en mode Split (1/80).

★ **Identification des constituants**

La méthode d'identification est basée sur la comparaison du spectre de masse, obtenu pour chacun des composés de l'huile essentielle lors de la fragmentation de nos solutés, avec une banque de spectres de produits de référence (Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; National Institute of Standards and Technology, 1999 ; König et al., 2001 ; Adams, 2007).

II.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN du ^{13}C sans séparation préalable est mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (Tomi et al., 1995), est basée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire.

★ **Conditions opératoires**

Les spectres RMN ont été enregistrés dans le chloroforme deutéré, sur un spectromètre de marque « Bruker AVANCE 400 », opérant à 100,623 MHz pour le carbone 13, sous les conditions opératoires suivantes : Sonde de 5 mm, durée d'impulsion (PW) : 4 μs (angle 45°), temps d'acquisition : 2,7 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spéciale (SW) de 24 000 Hz (240 ppm), résolution digitale : 0,183 Hz/pt, mode de découplage pulsé (Composite Phase Decoupling), le nombre d'accumulation est compris entre 2 000 et 3 000 pour chaque enregistrement. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS (Tétraméthylsilane) pris comme référence interne. L'analyse d'un mélange est menée sur un échantillon de 40 mg dilué dans 0,5 ml de chloroforme deutéré (CDCl_3).

★ **Identification des constituants**

L'identification est réalisée par la prise en compte du nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, du nombre de superpositions des signaux et des variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$). En plus de ces paramètres qui sont directement accessibles par un logiciel élaborés au laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'Université de Corse (Tomi et al., 1995 ; Rezzi et al., 2002 ; Tomi et Casanova, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009), l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Cette technique permet l'identification de

différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0,3-0,4% sans purification précédente.

Chapitre 3 : Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des différents extraits de plantes

I. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de nos différentes plantes a été réalisée par quatre techniques chimiques à savoir : capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le test de blanchiment du β -carotène.

I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto et al. (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) à molybdène Mo (V) en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate Mo (V) à pH acide.

Un volume de 0,3 ml de chaque extrait est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0,3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligrammes équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées 3 fois.

I.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**. Dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Les absorbances mesurées à 515 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH ; qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Parejo et al., 2002**).

50 μ l de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l). En

parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Les contrôles positifs sont représentés par des solutions d'antioxydants standards ; l'acide ascorbique et le BHA dont les absorbances ont été mesurés dans les mêmes conditions que les échantillons.

★ Expression des résultats

Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs c} - \text{Abs e})}{\text{Abs c}} \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Calcul des concentrations inhibitrices (IC₅₀) :

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Samarth et al., 2008**).

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (**Brand-williams et al., 1995**).

IC₅₀ : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

I.3. Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**, basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺.

➤ 1 ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1% (m/v).

- L'ensemble est incubé au bain marie à 50 °C pendant 20 minutes ensuite ;
- 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction ;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ;
- 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

A des fins comparatives, trois antioxydants standards sont utilisés : l'acide ascorbique, le BHA et le Trolox.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

I.4. Test de blanchiment du β -carotène

La capacité des extraits à inhiber la décoloration du β -carotène a été déterminée selon **Koleva et al. , (2002)** avec des modifications mineures. 2 mg de β -carotène ont été dissout dans 20 ml de chloroforme et 4 ml de cette solution ont été ajoutés à de l'acide linoléique (40 mg) et du Tween 40 (400 mg). Le chloroforme a été évaporé sous vide à 40°C et on ajoute 100 ml d'eau oxygénée. Une émulsion a été obtenue par agitation vigoureuse.

Des aliquotes de cette émulsion (150 μ l) ont été réparties dans une microplaque à 96 puits en présence de (10 μ l) des extraits méthanoliques à différentes concentrations. Deux répétitions ont été préparées pour chaque extrait. La microplaque a été ensuite incubée à 50 °C pendant 120 min, et l'absorbance a été mesurée (à T=0 et T=120 mn) à 470 nm en utilisant un lecteur de microplaque. A des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés : l'acide gallique et le Trolox.

L'activité de l'extrait est calculée par rapport à celles du contrôle (sans extrait). en termes d'inhibition de la décoloration du β -carotène en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition du blanchiment du } \beta\text{-carotène (en\%)} = [(S - A_{120}) / (A_0 - A_{120}) \times 100]$$

Où :

A_0 : absorbance du contrôle à 0 mn.

A_{120} : absorbance du contrôle à 0 mn 120 min.

S : absorbance de l'échantillon à 120 min.

Cette activité est également exprimée en IC₅₀ (mg/ml) comme décrit pour le test du DPPH`.

I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles des différentes parties de *N. nepetella*, *M. rotundifolia* et *S. Molle* a été évaluée par deux méthodes ; le test de la réduction du radical libre du DPPH et le test du blanchiment du β-carotène.

• Méthode de piégeage du radical libre DPPH

La méthode appliquée est celle de **Tappel et Mellors, (1996)**. Elle consiste à dissoudre 2 mg de DPPH dans 50 ml d'éthanol. Deux millilitres de cette solution sont additionnés à 100 µl de la solution méthanolique contenant de l'huile essentielle à différentes concentrations.

Après 30 min à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre à 517 nm.

Pour chaque dilution, un blanc est préparé à partir de 2 ml de méthanol additionnée à 100 µl d'extrait.

Un contrôle négatif est composé de 2 ml du DPPH et de 100 µl de méthanol.

L'antioxydant de référence (acide ascorbique) a été préparé par la même méthode.

Les pourcentages d'inhibition sont calculés en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [A_0 - A / A] \times 100$$

A₀ : Absorbance du contrôle ;

A : Absorbance de l'échantillon ;

• Test de blanchiment du β-carotène

La capacité des huiles essentielles à inhiber la décoloration du β-carotène a été déterminée de la même façon que pour les extraits selon **Koleva et al., (2002)**.

I.6. Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimés par une moyenne et plus ou moins l'écart type.

II. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes

Dans un premier temps, nous avons testé les extraits des espèces végétales vis-à-vis des souches microbiennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) en milieu liquide.

II.1. Souches bactériennes et fongiques testées

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur neuf souches pathogènes (**Tableau 2**). Les souches bactériennes et fongiques proviennent du Laboratoire des Produits Naturels alors que les levures nous ont été fournies par le Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique, Université de Tlemcen.

Tableau 2. Les différentes souches microbiennes testées

Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Candida albicans</i> IP 444
Moisissures	<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294
	<i>Aspergillus fumigatus</i> MNHN 566

➤ Mise en culture des souches

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4 °C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1 °C pour les levures pendant 24 h à 48 h, puisensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté.

Après 24 h d'incubation à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1 °C pour la levure, les souches sontensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à 37±1 °C pour les bactéries et

30±1 °C pour les levures pendant 18 h. De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les met dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0,5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (DO = 0,08 à 0,1 / $\lambda = 625$ nm) (Pessini et al., 2003), et $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour les levures (DO = 0,12 à 0,15 / $\lambda = 530$ nm). Pour les moisissures, les suspensions (préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont ajustées à 10^6 spores/ml, ce qui correspond à une transmittance de 68-82 % ($\lambda = 530$ nm) (Pfaller et al., 1998).

II.2. Méthode de diffusion sur disque

Afin de tester l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons utilisé la méthode de l'aromatogramme par diffusion à partir de disques imprégnés.

Pour effectuer le test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µl d'extraits (300 µg/disque) solubilisés dans le DMSO et 20 µl pour les huiles essentielles (15 µl d'huile essentielle et 5 µl de DMSO) sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri (3 disques par boîte), préalablementensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension microbienne (10^6 UFC/ml pour les levures et souches bactériennes sauf *S. aureus* qui a été ensemencée à 10^7 UFC/ml et 10^4 spores/ml pour les moisissures) pendant 10 – 15 min. L'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration (Joffin et Leyral, 2001).

Les milieux de culture utilisés, sont la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, le milieu Sabouraud pour les levures et le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour les moisissures.

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (20 µl/disque) et des témoins positifs : antibiotiques [ampicilline (10 µg/disque), oxacilline (1 µg/disque), ofloxacine (5 µg/disque), céphalexine (30 µg/disque), amoxicilline (25 µg/disque), vancomycine (30 µg/disque) et ciprofloxacine (5 µg/disque)]; antifongique (nystatine (30 µg/disque)).

Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37±1 °C pendant 18-24 h pour les bactéries, à 30±1 °C pendant 24-48 h pour les levures et à 25±1 °C pendant 3 jours pour les moisissures. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus.

II.3. Méthode de micro-dilution en milieu liquide :

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF). La méthode décrite par **Okusa et al. (2007)**, avec une légère modification à été employée.

200 µl d'une solution préparée à partir de 2 ml de bouillon Mueller Hinton, 40 µl d'huile essentielle et 40 µl de DMSO, sont transférés dans une microplaque à 96 puits et une gamme de concentrations de chaque huile essentielle est effectuée par des dilutions au demi dans les milieux de culture.

A partir d'une culture microbienne de 24 h d'incubation, nous avons préparé un inoculum de 10^6 UFC/ml (pour les bactéries) et 10^4 UFC/ml (pour les levures) dans une solution de chlorure de sodium (0,9%). Ensuite 100 µl de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à 30 ± 1 °C ou 37 ± 1 °C pendant 24 ou 48 h. Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 20 et 0,156 µl/ml. Deux puits représentent les témoins négatifs : un 1^{er} puits contient le milieu de culture et l'inoculum et un 2^{ème} puits contient uniquement le milieu de culture.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**). La turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

La concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,01% de survivants). Elle définit l'effet bactéricide ou fongicide d'un échantillon donné. Des prélèvements sont effectués dans le puits témoin et dans chacun des puits dépourvus de culot microbien puis déposés « en spots » sur gélose Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures. Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37 ± 1 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 30 ± 1 °C pendant 24 à 48 h pour les levures.

La CMB de nos huiles essentielles est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie ou de levure. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

3^{ème} partie : Résultats et discussion

L'Ouest algérien renferme une flore très riche et peu valorisée. Parmi cette végétation qui se raréfie, on trouve les plantes médicinales traditionnellement utilisées par nos ancêtres à des fins thérapeutiques.

Un des axes de recherche développé par le laboratoire LAPRONA consiste à valoriser les plantes de la région d'un point de vue de leur potentiel chimique et biologique.

Notre travail est une contribution à l'étude des activités biologiques et de la phytochimie de différentes parties de cinq espèces végétales de l'Ouest algérien à savoir *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*.

Chapitre 1 : Screening phytochimique, extraction des composés phénoliques et leurs teneurs

I. Tests phytochimiques

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de différents extraits des plantes étudiées par screening chimique sont représentés dans le tableau 3. Nous remarquons que les feuilles et les tiges de *N. nepetella* contiennent des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes, et des huiles volatiles. Cependant, les deux parties étudiées de la plante ne contiennent pas des coumarines.

Ces tests montrent aussi que les extraits des feuilles et des tiges de *M. rotundifolia* sont riches en composés phénoliques tel que les flavonoïdes et les tanins. Les feuilles contiennent une part importante des huiles volatiles. Les alcaloïdes et les saponosides sont inexistantes dans les deux parties de cette espèce.

Par ailleurs, nous constatons que les tiges et les feuilles de *M. arvensis* contiennent des tanins et des flavonoïdes. Les coumarines et les huiles volatiles sont présentes en faibles quantités. Par ailleurs les extraits des deux parties étudiées feuilles et tiges ne contiennent ni les saponosides ni les alcaloïdes.

Les feuilles d'*A. canescens* nous indiquent leur richesse en flavonoïdes, en saponosides, en composés réducteurs et en tanins comparés aux tiges. Les huiles volatiles, les alcaloïdes et les anthocyanosides sont inexistantes dans les deux parties étudiées d'*A. canescens*.

Pour les deux parties feuilles et tiges de l'espèce *S. molle*, les tests ont révélé la présence de composés phénoliques flavonoïdes et tanins ainsi que des huiles volatiles, et un test faiblement positif aux alcaloïdes.

Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'extraction sélective de quelques métabolites présents dans *N. nepetella*, *M. rotundifolia*, *M. arvensis*, *A. canescens* et *Schinus molle*.

Tableau 3. Résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les différentes parties des espèces végétales étudiées

Classes recherchées	Plantes étudiées									
	<i>N. nepetella</i>		<i>M. rotundifolia</i>		<i>M. arvensis</i>		<i>A. canescens</i>		<i>S. molle</i>	
	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Fruits
Flavonoïdes	++	+	++	+	++	+++	+++	++	++	++
Tanins	+++	++	+++	++	+	++	++	+	++	++
Anthocyanosides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracénosides	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coumarines	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Alcaloïdes sels	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloïdes bases	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Saponosides	+	+	+	+	-	-	+++	+	-	-
Stérols et stéroïdes	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-
Acides gras	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Huiles volatiles	+++	++	+++	++	+	+	-	-	++	++
Composés réducteurs	+	+	+	+	-	-	++	++	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Les résultats sont classés selon :

Réaction négative : -

Réaction faiblement positive : +

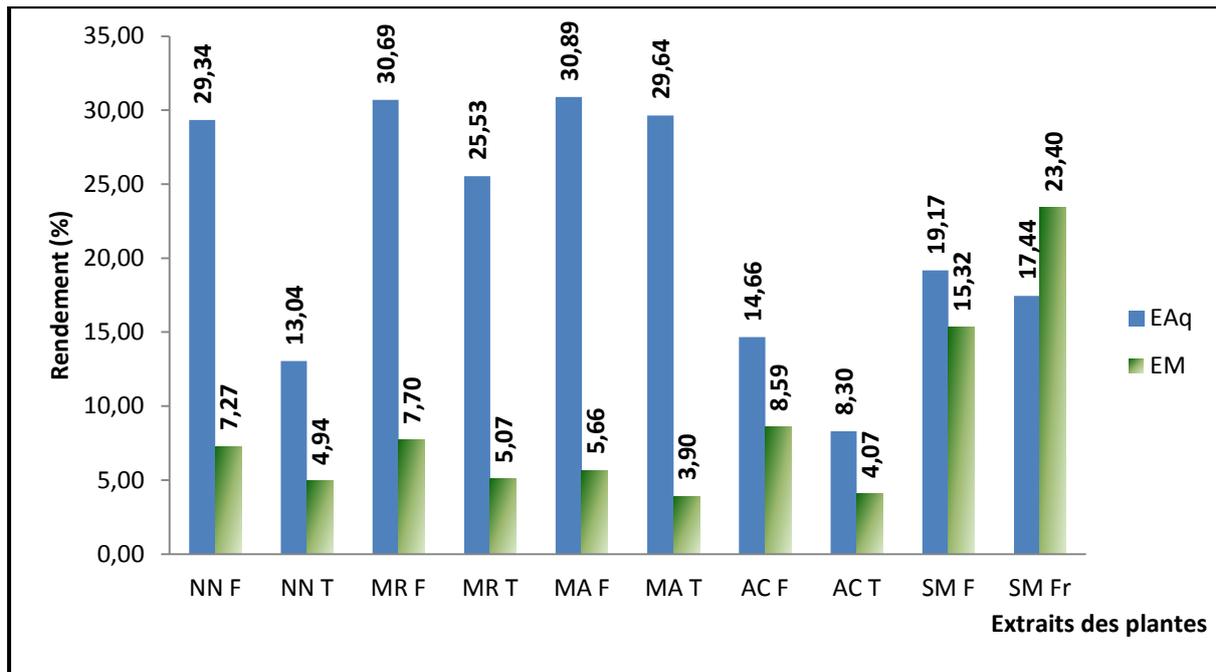
Réaction moyennement positive : ++

Réaction fortement positive : +++

II. Les composés phénoliques

II.1 . Rendements des extraits bruts obtenus

L'extraction des composés phénoliques par le méthanol et par l'eau à chaud des différentes parties des espèces végétales étudiées, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits bruts (**Figure 10**).



EAq : Extrait aqueux, EM : Extrait méthanolique ; NN : *Nepeta nepetella* ; MR : *Mentha rotundifolia* ; MA : *Moricandia arvensis* ; AC : *Atriplex canescens* ; F : feuilles ; Fr : Fruits ; T : tiges.

Figure 10 : Rendements en (%) des extraits bruts aqueux et méthanoliques des plantes étudiées

Nous remarquons que les extraits bruts aqueux des feuilles de *M. arvensis*, *M. rotundifolia* et de *N. nepetella* enregistrent des rendements élevés de l'ordre de 30,89%, 30,69%, et de 29,34% respectivement, alors que pour les extraits bruts méthanoliques nous constatons que les fruits de *S. molle* possèdent le rendement le plus élevé avec 23,40% suivi par celui des feuilles 15,32% ensuite vient l'extrait des feuilles d'*A. canescens* avec une valeur de 8,59%. Les rendements des autres extraits méthanoliques varient de 3,90% à 7,70%.

De ces résultats nous constatons que l'extrait aqueux donne pratiquement les meilleurs rendements d'extraction par rapport à l'extrait méthanolique. Ce qui corrobore avec les travaux de **Majhenic et al., 2007** qui ont démontré que l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante et qu'ils sont plus élevés pour l'extrait brut aqueux que méthanolique. Cependant, il reste difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions environnementales, à la durée du stockage, à la période de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées, le rapport poids de la plante/volume du solvant et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

II.2. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés

Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (**Falleh et al., 2008**). La raison principale pour laquelle les teneurs en flavonoïdes doivent être déterminées réside dans le fait qu'ils constituent la classe phénolique la plus importante avec plus de 5 000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

II.2.1. Courbes d'étalonnage des dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage exprimées respectivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche.

II.2.2.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de phénols totaux

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9982$ (**Figure 11**).

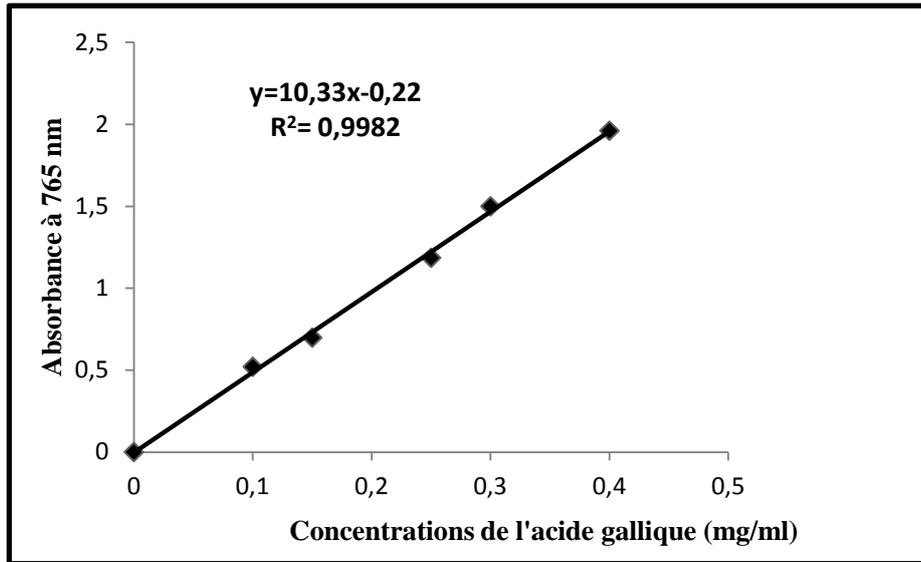


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

II.2.2.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la catéchine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9915$ (Figure 12). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS).

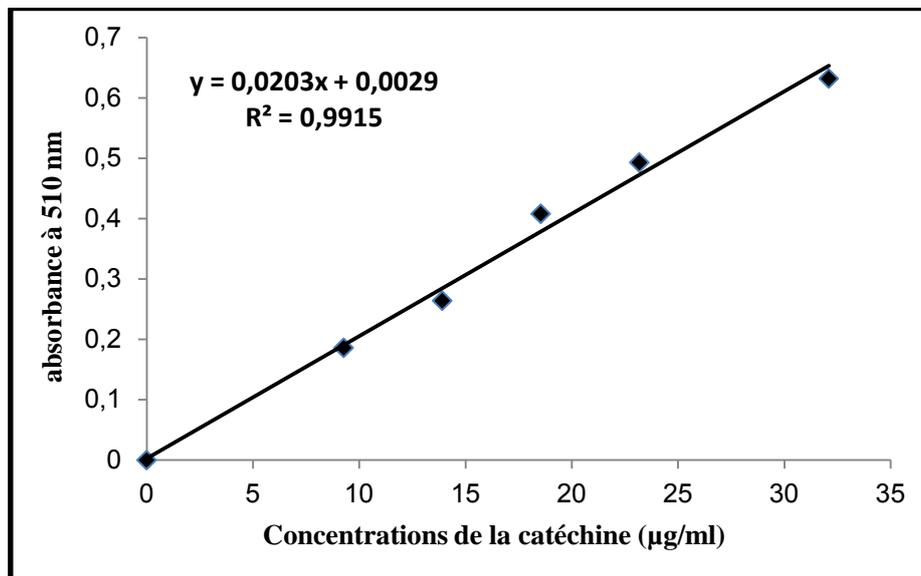


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

II.2.2.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

La courbe est établie en utilisant la catéchine comme référence (**Figure 13**).

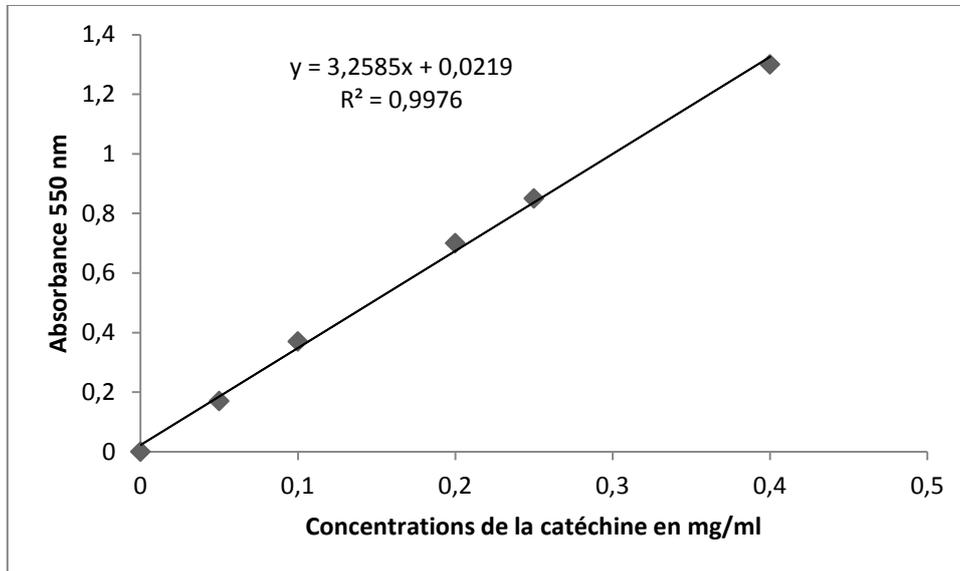


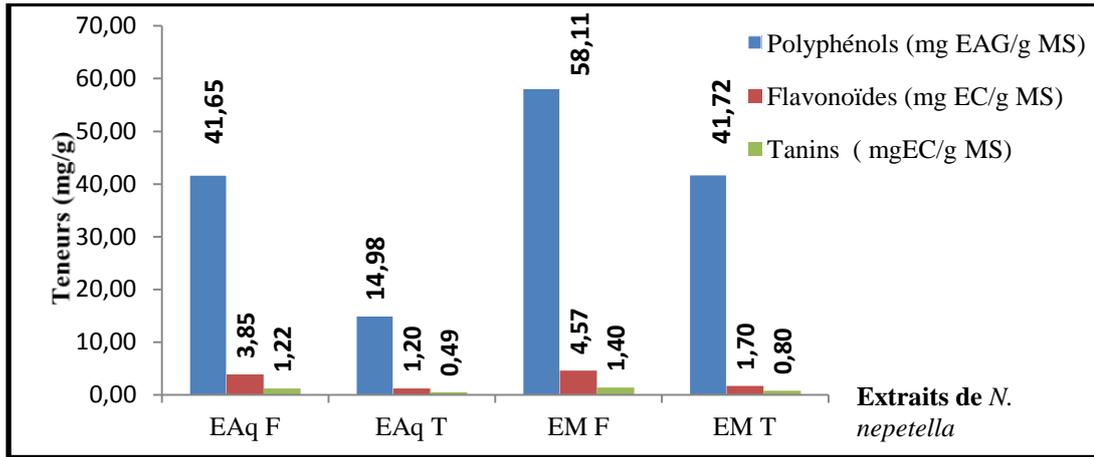
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

II.2.2. Analyses quantitatives des extraits

a. Extraits de *Nepeta nepetella*

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des parties feuilles et tiges de *N. nepetella* étudiées sont représentés ci-dessous dans la figure 14. Nous constatons que les extraits méthanoliques des feuilles sont quantitativement plus riches en composés phénoliques à savoir polyphénols et flavonoïdes que les extraits aqueux de la même partie. Les tanins sont présents mais en très faibles quantités allant de $0,80 \pm 0,19$ à $1,40 \pm 0,07$ mg EC/g MS pour l'extrait méthanolique des tiges et l'extrait méthanolique des feuilles respectivement.

La teneur en polyphénols de l'extrait aqueux reste nettement supérieure à celle trouvée par **Deliorman Orhan** et ses collaborateurs (2012) $4,81$ mg EAG/g MS, qui ont travaillé sur un infusé d'une autre espèce du genre *Nepeta* en l'occurrence *Nepeta italica* L.



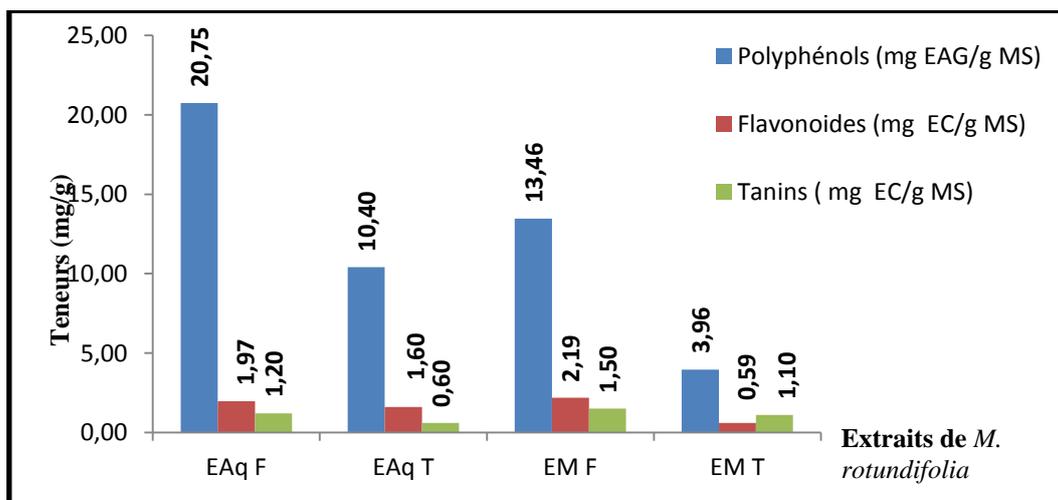
EAq : Extrait aqueux ; EM : Extrait méthanolique ; F : Feuilles ; T : Tiges

Figure 14 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de *N. nepetella*

b. Extraits de *Mentha rotundifolia*

La figure 15 montre les résultats des teneurs en composés phénoliques des extraits de *M. rotundifolia* analysés par spectrophotométrie. Ces résultats montrent que l'extrait aqueux des feuilles est le plus riche en phénols totaux suivi de l'extrait méthanolique de la même partie, pour les flavonoïdes l'extrait méthanolique des feuilles détient la valeur la plus élevée de l'ordre de $2,19 \pm 0,08$ mg EC/g MS.

La quantité des polyphénols varie d'une manière décroissante des extraits de feuilles aux extraits des tiges : Extrait aqueux des feuilles > extrait méthanolique des feuilles > extrait aqueux des tiges > extrait méthanolique des tiges.

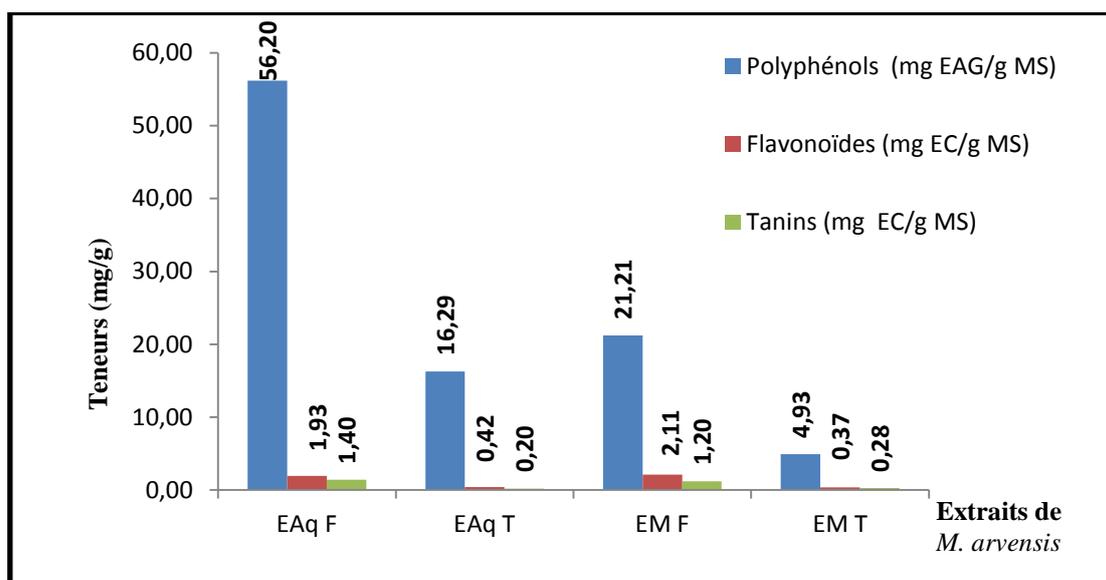


EAq : Extrait aqueux, EM : Extrait méthanolique ; F : Feuilles ; T : Tiges

Figure 15 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de *M. rotundifolia*

c. Extraits de *Moricandia arvensis*

Dans la **figure 16**, sont présentés les teneurs en composés phénoliques dans les extraits bruts aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges de *M. arvensis* analysées. De cette composition, nous constatons que l'extrait aqueux des feuilles de *M. arvensis* est plus riche en polyphénols avec une teneur de $56,20 \pm 0,50$ mg EAG/g MS tandis que son contenu en flavonoïdes est très faible ($1,93 \pm 0,40$ mg EC/g MS).

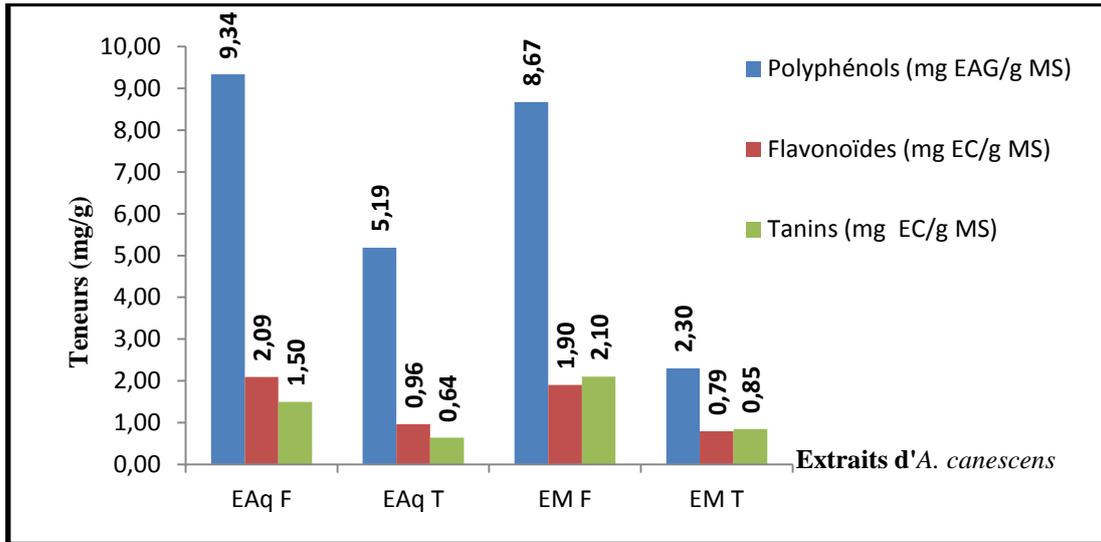


EAq : Extrait aqueux, EM : Extrait méthanolique ; F : Feuilles ; T : Tiges

Figure 16: Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de *M. arvensis*

d. Extraits d'*Atriplex canescens*

En analysant les résultats des teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux dans les extraits bruts aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges d'*A. canescens* qui sont représentés dans la **figure 17**, nous remarquons que l'extrait aqueux des feuilles est le plus riche avec une teneur de $9,34 \pm 1,24$ mg EAG/g MS suivi de l'extrait méthanolique des feuilles $8,67 \pm 1,71$ mg EAG/g MS. La teneur de flavonoïdes varie entre $0,79 \pm 0,02$ mg EC/g MS et $2,09 \pm 0,08$ mg EC/g MS.

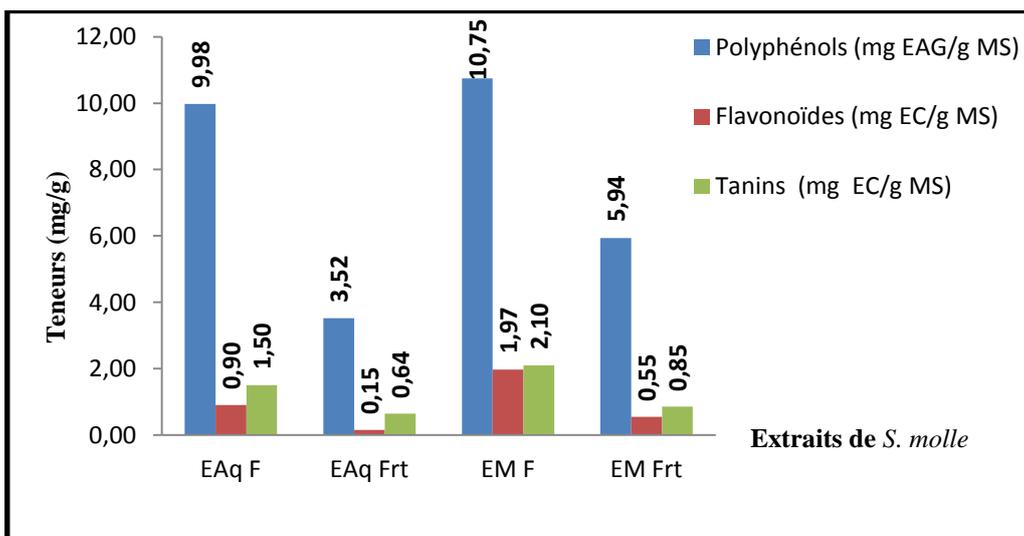


EAq : Extrait aqueux ; EM : Extrait méthanolique ; F : Feuilles ; T : Tiges

Figure 17 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts d'*A. canescens*

e. Extraits de *Schinus molle*

Les résultats des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins dans les extraits bruts aqueux et méthanoliques des feuilles et des fruits de *S. molle* sont représentés dans la figure 18. Nous constatons que l'extrait méthanolique des feuilles est le plus riche avec une teneur de $10,75 \pm 0,18$ mg EAG/g MS suivi de l'extrait méthanolique des feuilles $9,98 \pm 0,6$ mg EAG/g MS. La teneur des flavonoïdes varie entre $0,15 \pm 0,01$ et $1,97 \pm 0,10$ mg EC/g MS.



EAq : Extrait aqueux ; EM : Extrait méthanolique ; F : Feuilles ; T : Tiges

Figure 18 : Teneurs des dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits bruts de *Schinus molle*

Comme nous pouvons le constater dans le **tableau 4**, une teneur élevée en phénols totaux n'est pas toujours accompagnée par une forte teneur en flavonoïdes, mais le pourcentage de contribution des flavonoïdes aux phénols totaux varie entre les extraits bruts aqueux et méthanoliques, nous remarquons aussi que le rapport flavonoïdes/polyphénols est plus important pour les extraits méthanoliques que les extraits aqueux.

Tableau 4. Rendements et dosages des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés des extraits bruts aqueux et méthanoliques

Extraits des plantes		Rendements (%)	Phénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Tanins (mg EC/g MS)	Rapport flavonoïdes/ phénols totaux (%)	
<i>Nepeta nepetella</i> (Lamiacées)	EAq	Feuilles	29,34±1,68	41,65±2,18	3,85±1,17	1,22±0,15	9,24
		Tiges	13,04±0,12	14,98±1,07	1,2±0,8	0,49±0,59	8,01
	EM	Feuilles	07,27±0,79	58,11± 1,24	4,57±0,38	1,40±0,07	7,86
		Tiges	04,94±0,38	41,725±0,38	1,70±0,13	0,80±0,19	4,07
<i>Mentha rotundifolia</i> (Lamiacées)	EAq	Feuilles	30,69±0,72	20,75±0,64	1,97±0,04	1,20±0,70	9,49
		Tiges	25,53±0,52	10,40±0,61	1,60±0,01	0,60±0,03	15,38
	EM	Feuilles	07,70±0,57	13,46± 0,97	2,19±0,08	1,50±0,70	16,27
		Tiges	05,07±0,37	3,96±0,35	0,59±0,03	1,10±0,00	14,89
<i>Moricandia arvensis</i> (Brassicacées)	EAq	Feuilles	30,89±0,29	56,20±0,50	1,93±0,40	1,40±0,3	3,43
		Tiges	29,64±0,69	16,29±1,51	0,42±0,57	0,2±0,01	2,57
	EM	Feuilles	05,66±0,77	21,21±0,47	2,11±0,15	1,2±0,64	9,94
		Tiges	03,90±0,31	4,93±0,25	0,37±0,02	0,28±0,07	7,50
<i>Atriplex canescens</i> (Amaranthacées)	EAq	Feuilles	14,66±0,83	9,34±1,24	2,09±0,08	1,5±0,11	22,37
		Tiges	08,30±0,70	5,19±1,29	0,96±0,03	0,64±0,4	18,71
	EM	Feuilles	08,59±0,73	8,67±1,71	1,90±0,04	2,1±0,19	21,91
		Tiges	04,07±0,38	2,30±0,28	0,79±0,02	0,85±0,07	34,34
<i>Schinus molle</i> (Anacardiacees)	EAq	Feuilles	19,17±0,47	9,98±0,60	0,9±0,07	1,5±0,00	9,01
		Fruits	17,44±1,07	3,52±0,82	0,15±0,01	0,64±0,48	4,26
	EM	Feuilles	15,32±0,25	10,75±0,18	1,97±0,10	2,1±0,15	18,32
		Fruits	23,40±3,68	5,94±0,20	0,55±0,12	0,85±0,03	25,38

EAq : Extrait aqueux ; EM : Extrait méthanolique.

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques des espèces étudiées ont été réalisés. Cependant, on a remarqué que l'extraction à chaud a donné de meilleures teneurs en composés phénoliques que celle à froid.

Les faibles teneurs en tanins dans les plantes étudiées, comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Plusieurs travaux, ont montré que les tanins sont mieux extraits par un mélange acétone/eau (70/30) (**Chavan et al., 2001; Macheix et al., 2005 ; Trabelsi et al., 2010**).

Il est à noter que cette variabilité des teneurs en composés phénoliques est généralement corrélée avec l'importance des activités biologiques. D'ailleurs, et d'une manière générale, le pouvoir antioxydant est fortement corrélé à la concentration en composés phénoliques (**Hanson et al., 2004**). C'est pourquoi, nous nous intéressons par la suite à l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ces mêmes extraits.

Chapitre 2 : Extraction et caractérisation des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* et *Schinus molle*

I. Rendements en huiles essentielles

Les huiles essentielles des trois espèces végétales *Nepeta nepetella* (feuilles, fleurs et parties aériennes), *Mentha rotundifolia* (feuilles et parties aériennes) et *Schinus molle* (feuilles et fruits) est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau.

Le poids des huiles essentielles, nous a permis de calculer le rendement pour chaque partie utilisée. Les résultats des rendements obtenus à partir des différentes parties des plantes sèches sont reportés dans l'histogramme (**Figure 19**).

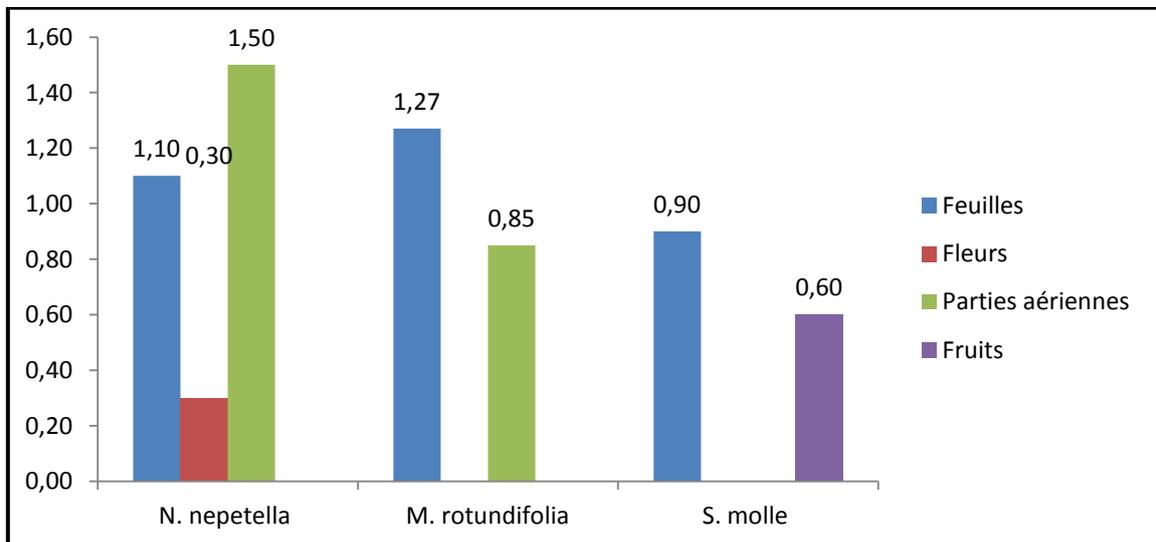


Figure 19 : Rendements en huiles essentielles de *N. nepetella*, *M. rotundifolia* et *S. molle* obtenues par entraînement à la vapeur d'eau

Pour *Nepeta nepetella*, nous remarquons que la teneur en huile essentielle des parties aériennes (1,50%) est cinq fois plus élevée que celle des fleurs (0,30%), celle des feuilles est de 1,10%.

En ce qui concerne *Mentha rotundifolia*, les résultats obtenus indiquent que les feuilles possèdent une meilleure teneur en huile essentielle que les parties aériennes avec 1,27% et 0,85% respectivement.

Les résultats du rendement en huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle* ont montré que les feuilles (0,90%) sont relativement plus riches en essences que les fruits (0,60%).

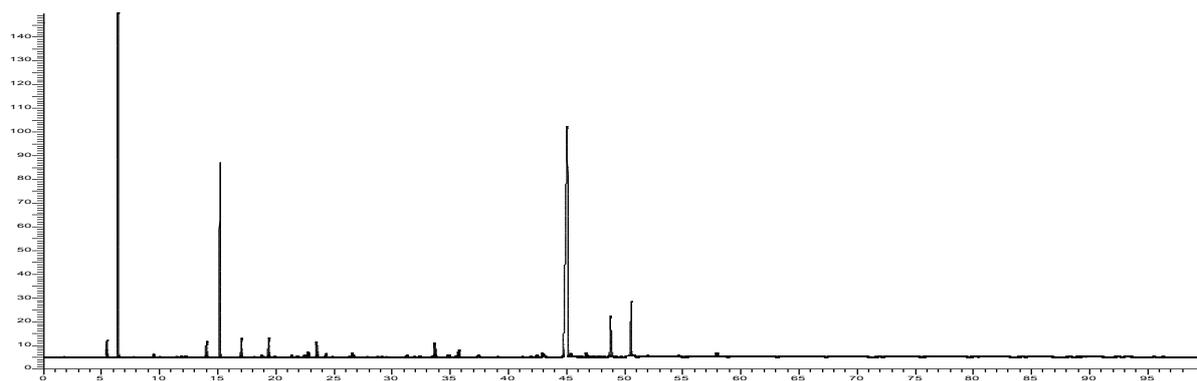
II. Composition chimique des huiles essentielles

L'identification des constituants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs (utilisation de la banque « Arômes » constituée au laboratoire de Chimie et Biomasse en Corse). L'identification par RMN du carbone-13 sans séparation préalable s'est déroulée en tenant compte de l'observation de tous les signaux de chaque constituant du mélange, par le contrôle des variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) et du nombre de superpositions.

II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Nepeta nepetella*

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles, des fleurs et des parties aériennes de la plante *Nepeta nepetella* est donnée dans le **tableau 5**, leurs chromatogrammes sont représentés sur **les figures 20, 21 et 22**, les spectres RMN¹³C sont caractérisés par un certain nombre de raies de résonance (**Annexe F**).

FT120573 2 NN Fe Apol



FT120573 2 NN Fe Pol

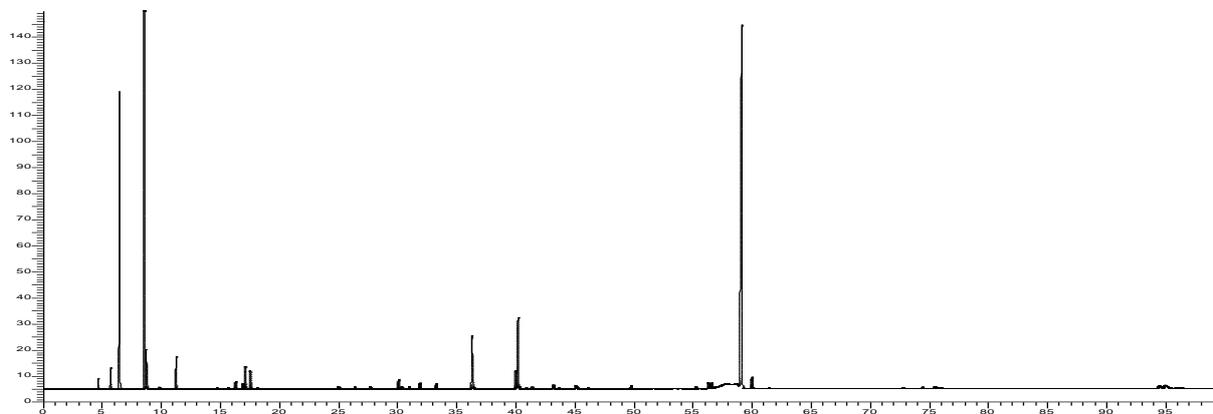
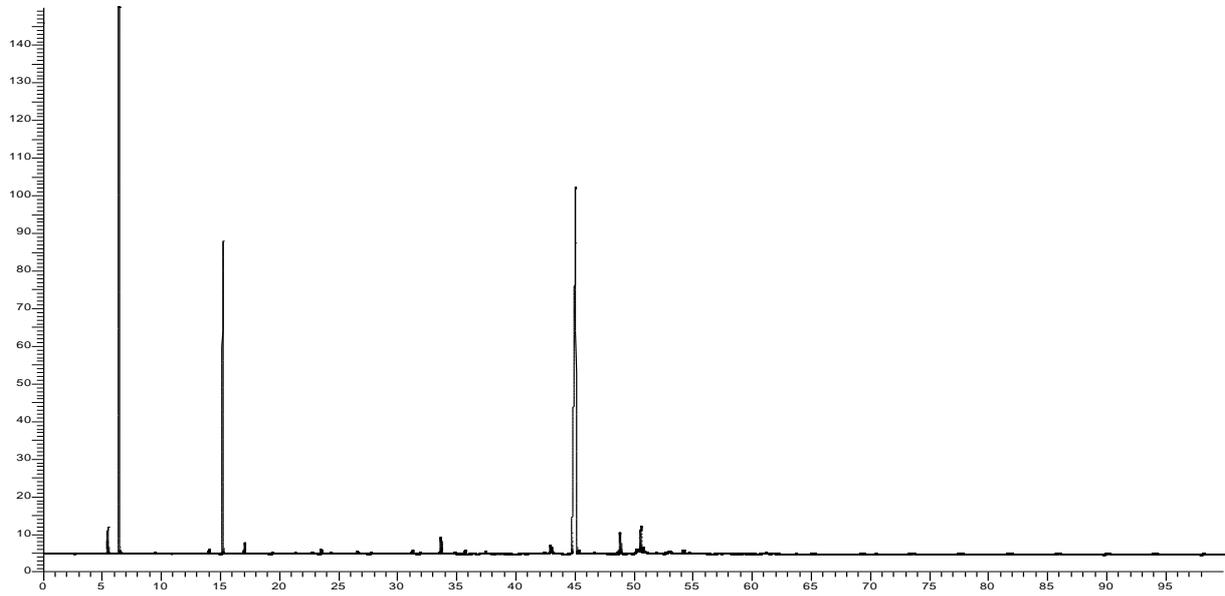


Figure 20 : Chromatogrammes des feuilles de *Nepeta nepetella* sur colonne apolaire et polaire

NN FI Apol



NN FI Pol

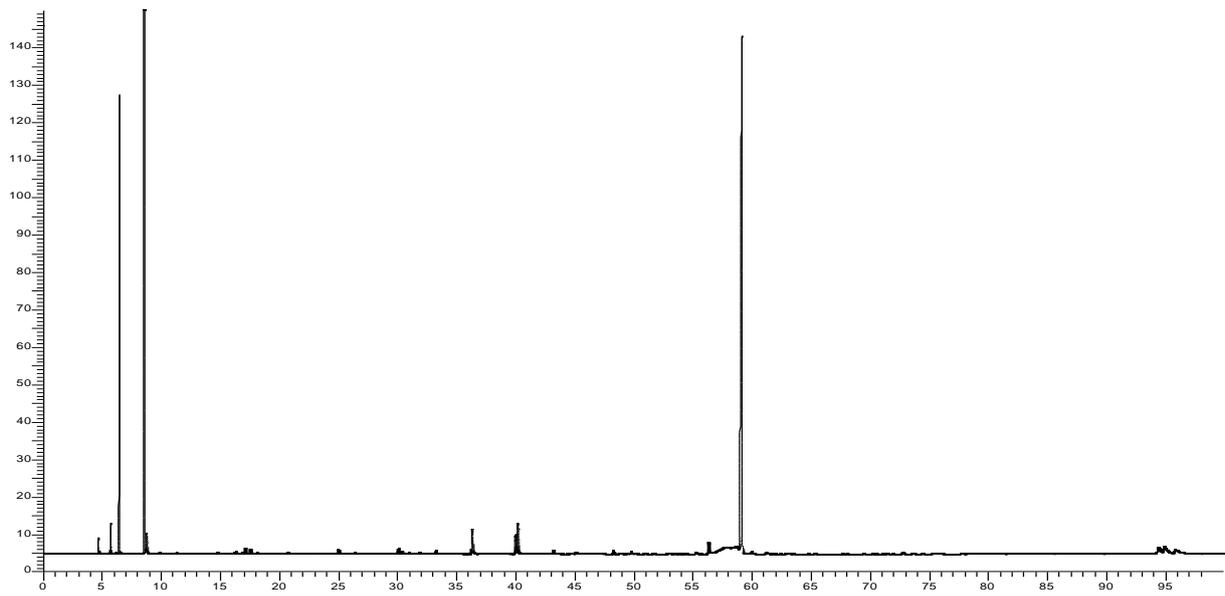
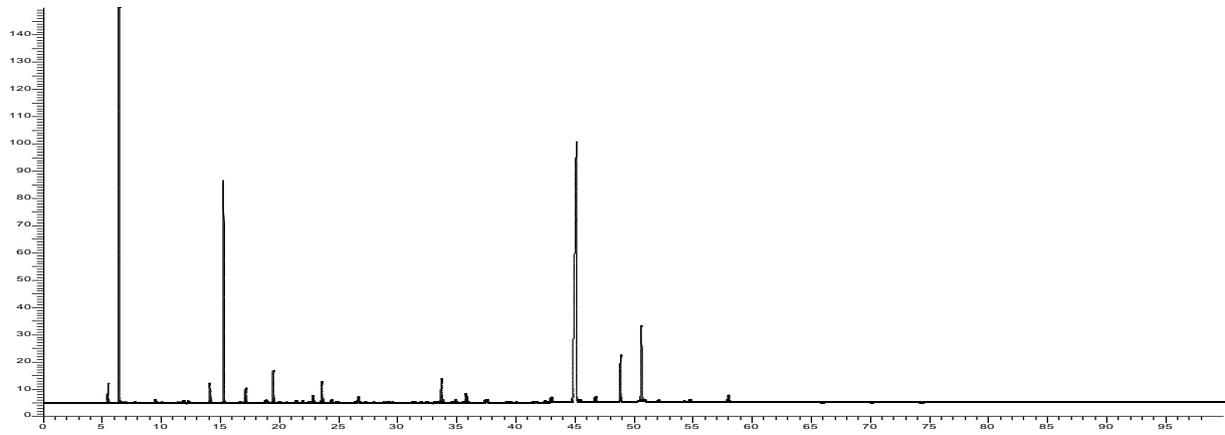


Figure 21 : Chromatogrammes des fleurs de *Nepeta nepetella* sur colonne apolaire et polaire

NN PA Apol



NN PA Pol

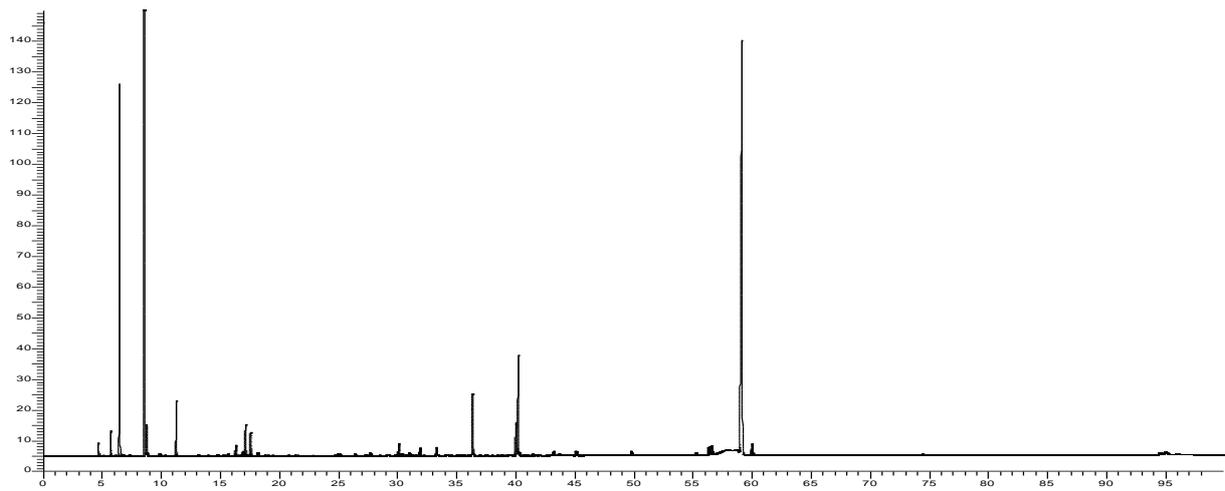


Figure 22 : Chromatogrammes des parties aériennes de *Nepeta nepetella* sur colonne apolaire et polaire

Tableau 5. Composition chimique des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*

Composés	Indice de rétention		Huiles essentielles (%)			Mode d'identification
	Ir ^a	Ir ^p	Feuilles	Fleurs	Parties aériennes	
α -Thujène	924	1013	-	-	0,1	Ir, SM
α -Pinène	931	1011	1,9	0,8	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Oct-1-èn-3-ol	960	1444	0,2	tr	0,2	Ir, SM
Sabinène	964	1127	tr	-	tr	Ir, SM
β -Pinène	971	1113	2,0	0,1	3,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1012	1272	0,1	tr	0,2	Ir, SM
Limonène	1021	1202	0,1	0,1	0,1	Ir, SM
β -Phellandrène	1021	1212	tr	-	tr	Ir, SM
(Z)- β -Ocimène	1025	1233	0,6	0,1	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
(E)- β -Ocimène	1037	1250	1,6	0,4	1,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Terpinène	1049	1246	0,4	0,1	0,3	Ir, SM
Linalol	1083	1542	0,6	0,2	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
Salicylate de méthyle	1181	1783	1,9	1,7	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
Géranial	1242	1727	0,3	0,2	0,2	Ir, SM
Nepetalactone 4 α ,7 α ,7 α	1326	nd	0,6	1,1	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Nepetalactone 4 α ,7 α ,7 β	1359	2027	67,9	82,3	64,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Bourbonène	1384	1505	0,5	0,1	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
(E)- β -Caryophyllène	1418	1595	5,1	2,1	5,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
(E)- β -Farnésène	1446	1664	6,6	3,0	7,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Humulène	1450	1666	0,3	0,6	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Germacrène D	1470	1711	0,1	-	0,2	Ir, SM
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	0,5	-	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total (%)			91,3	92,9	88,3	

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) ; Ir^a et Ir^p: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) ; Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0,1 % sont notés comme traces (tr) ; nd : non défini.

Les résultats de l'analyse varient quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée. L'étude a permis d'identifier 21 composés représentant 91,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, 17 pour les fleurs (92,9%) et 22 composés pour les parties aériennes (88,3%) (**Tableau 6**). Cette analyse est marquée par l'importante présence de monoterpènes oxygénés 83,8% pour les fleurs, 69,4% pour les feuilles et 65,8% pour les parties aériennes (**Figures 23, 24, 25**) avec le constituant le plus abondant nepetalactone 4 α ,7 α ,7 β qui représente à lui seul 67,9% de la composition totale des feuilles, 82,3% de celle des fleurs et 64,3% de celle des parties aériennes. Ce constituant représente à lui seul environ 97,8% de la composition en monoterpènes oxygénés des feuilles, 98,2% des fleurs et 97,7% des parties aériennes. La deuxième classe est celle des sesquiterpènes hydrocarbonés qui représente respectivement 14,0%, 12,6% et 5,8% pour les parties aériennes, les feuilles et les fleurs avec la prédominance de l'(E)- β -farnésène au niveau des trois parties de l'espèce *Nepeta nepetella* (**Figures 26**). Cependant, nous n'avons pas pu identifier de sesquiterpènes oxygénés au niveau des fleurs. Les composés non identifiés représentent 11,7% dans les parties aériennes, 8,7% dans les feuilles et 7,1% dans les fleurs.

Tableau 6. Bilan de l'étude des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*

Types de composés	Nombre de composés et leur %		
	Feuilles	Fleurs	Parties aériennes
Monoterpènes hydrocarbonés	9(6,7)	7(1,6)	10(7,5)
Monoterpènes oxygénés	4(69,4)	4(83,8)	4(65,8)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	5(12,6)	4(5,8)	5(14,0)
Sesquiterpènes oxygénés	1(0,5)	-	1(0,7)
Autres	2(2,1)	2(1,7)	2(0,3)
	% de composés identifiés		
	91,3	92,9	88,3
	% de composés non identifiés		
	8,7	7,1	11,7

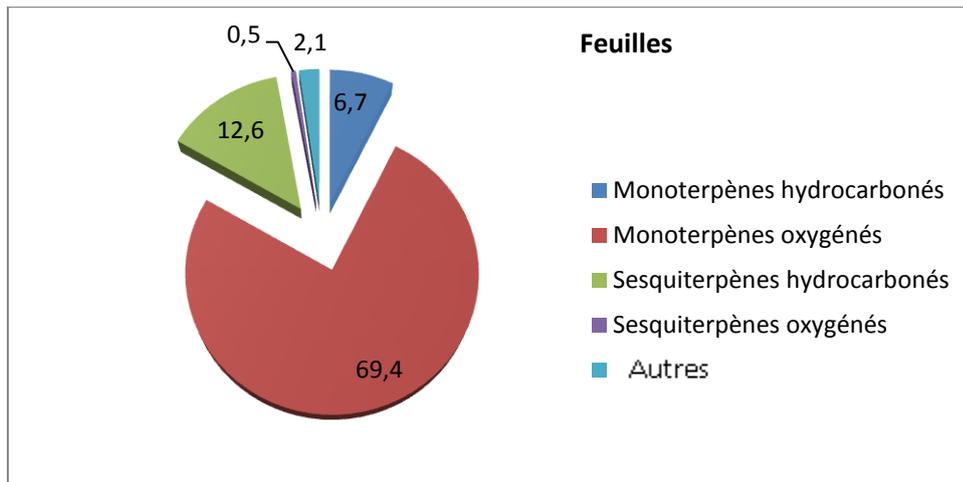


Figure 23 : Composés volatils présents dans les feuilles de *Nepeta nepetella*

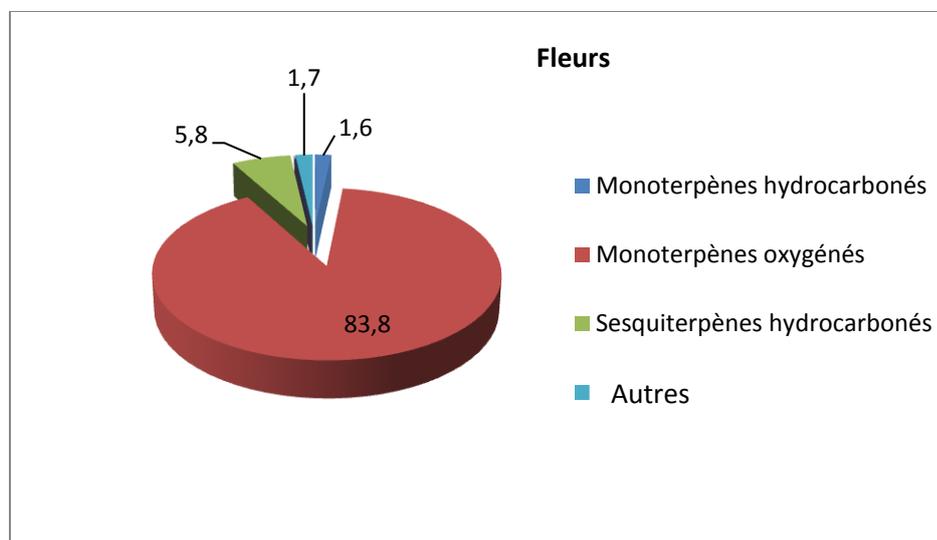


Figure 24 : Composés volatils présents dans les fleurs de *Nepeta nepetella*

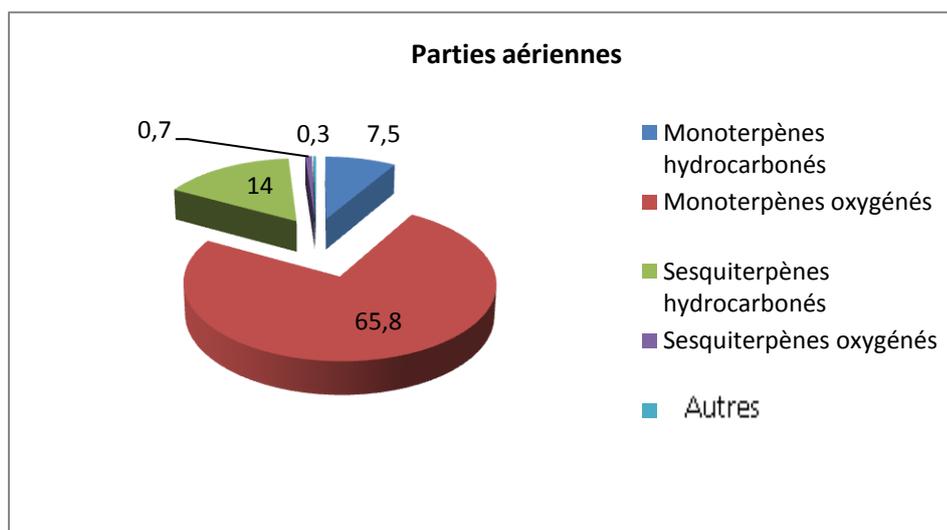


Figure 25 : Composés volatils présents dans les parties aériennes de *Nepeta nepetella*

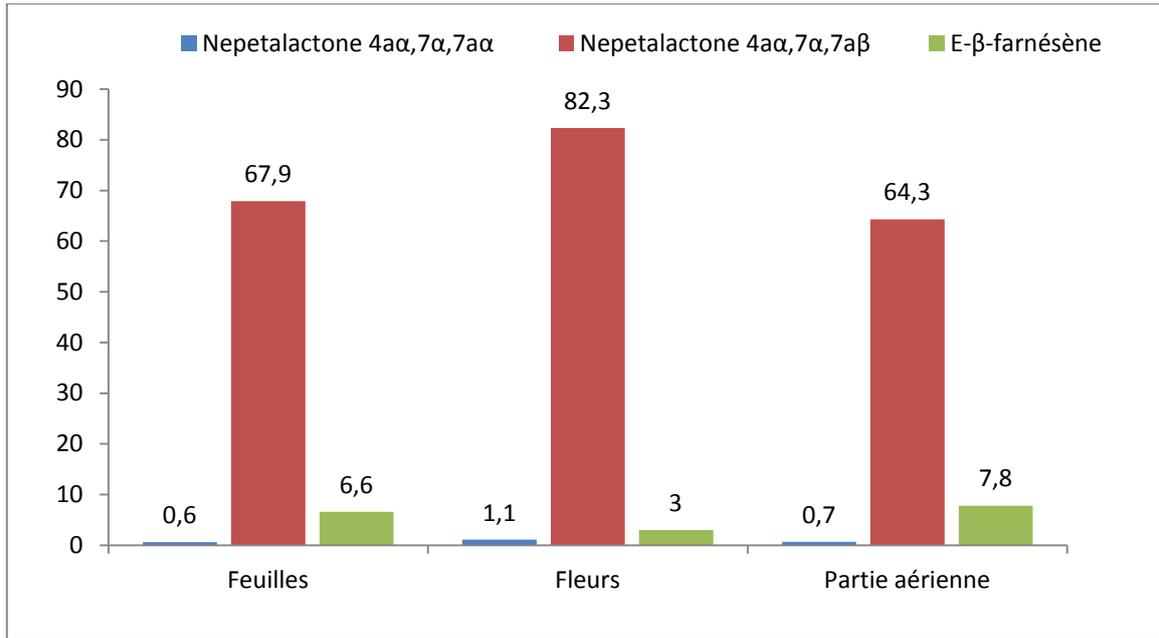


Figure 26 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des différentes parties de *Nepeta nepetella*

La majorité des travaux sur les huiles essentielles des espèces du genre *Nepeta* connues sous le nom de plantes à iridoides contiennent différents isomères de lactones monoterpéniques, les nepetalactones dont il a été mentionné en 1984 par **Bicchi et al.** leur présence à 76,5% dans l'espèce *Nepeta nepetella*.

Nous avons comparé nos résultats à d'autres travaux sur différentes espèces du genre *Nepeta* de diverses origines (**Tableau 7**). La prédominance de nepetalactone 4α,7α,7αβ dans notre espèce est comparable à *Nepeta racemosa* (**Baser et al., 1993**), *Nepeta rtanjensis* (**Chalchat et al., 2000**), *Nepeta angelica* sous-espèce *argolica* (**Tzakou et al., 2000**), ainsi qu'à celle des travaux de **Srifi et al. (2013)** sur plusieurs espèces du genre *Nepeta*. Par ailleurs, nous remarquons que pour la majorité des espèces du genre *Nepeta* le constituant 4α,7α,7αβ nepetalactone est majoritaire en comparaison au 4α,7α,7αα nepetalactone. Tout de même pour la même espèce *N. cataria* les pourcentages des nepetalactones sont variables (**Velasco-Negueruela et al., 1998 ; Srifi et al., 2013**), aussi d'autres travaux ont par ailleurs montré que les constituants nepetalactone 4α,7α,7αα et nepetalactone 4α,7α,7αβ ne sont pas présents dans certaines espèces du genre *Nepeta* (**Reynier et al., 1967 ; Bottini et al., 1987 ; Arnold et al., 1993a et b ; Cotrim et al., 1994 ; Handjieva et al., 1996**).

Gkinis et al. (2003) ont rapporté que la teneur en lactones monoterpéniques augmente au cours du cycle végétatif jusqu'à pleine floraison. Cependant, ce résultat n'était pas vérifié dans leurs travaux. Dans tous les cas, la composition des huiles essentielles varient en

fonction des régions, du sol et des conditions environnementales dans lesquelles les plantes ont été récoltées.

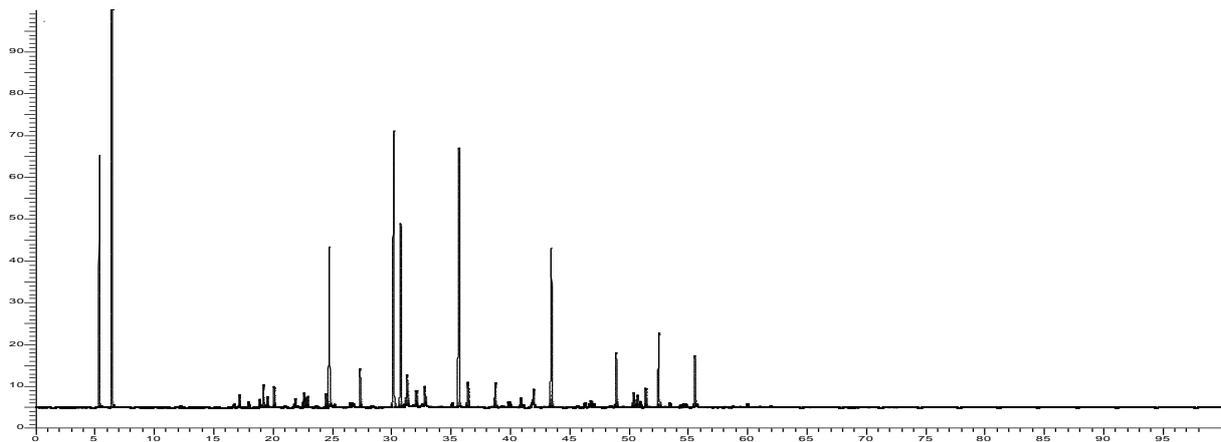
Tableau 7. Comparaison de teneurs en composés nepetalactones de nos échantillons avec celles de la littérature

Espèces étudiées	Constituants en (%)		Références bibliographiques
	Nepetalactone 4α,7α,7aa	Nepetalactone 4α,7α,7aβ	
<i>N. nuda</i>	0,9-7,1	6,7-76,6	De Pooter et al., 1987
<i>N. teydea</i>	1,4-89,5	0,4-0,9	Velasco-Negueruela et al., 1989
<i>N. racemosa</i>	-	31,5-91,6	Baser et al., 1993
<i>N. caesarea</i>	91,2-95,3	0,1-0,2	Baser et Özek, 1994
<i>N. nuda ssp. albiflora</i>	1,0	37,5	Kökdil et al., 1996
<i>N. grandiflora</i>	-	2,4	Handjieva et al., 1996
<i>N. sulfuriflora</i>	0,5	-	Kökdil et al., 1997
<i>N. cataria</i>	90,5	0,5	Velasco-Negueruela et al., 1998
<i>N. asterotrichus</i>	2,7	-	Rustaiyan et al., 1999
<i>N. binaludensis</i>	25,2	-	Rustaiyan et Nadji, 1999
<i>N. rtanjensis</i>	-	86,4	Chalchat et al., 2000
<i>N. cephalotes</i>	35,1	-	Rustaiyan et al., 2000a
<i>N. racemosa</i>	64,9	7,4	Rustaiyan et al., 2000b
<i>N. argolica subsp. argolica</i>	26,5	12,9	Skaltsa et al., 2000
<i>N. argolica subsp. argolica</i>	3,2-10,5	64,5-91,3	Tzakou et al., 2000
<i>N. parnassica</i> (Pleine floraison) : (Stade végétatif) :	17,3 1,5	8,9 22,0	Gkinis et al., 2003
<i>N. tuberosa ssp. reticulata</i>	--	76,87	Srfi et al., 2013
<i>N. granatensis</i>	--	39,44	
<i>N. cataria</i>	--	77,43	
<i>N. atlantica</i>	--	71,40	
<i>N. nepetella</i>	0,7	64,3	Nos travaux, 2014

II.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles de la plante *Mentha rotundifolia* varie quantitativement en fonction de la partie de la plante (parties aériennes et feuilles) (**Tableau 8**). Leurs chromatogrammes présentent le même profil sur les colonnes apolaire et polaire (**Figure 27**), les spectres RMN¹³C sont caractérisés par un certains nombre de raies de résonance (**Annexe F**).

Apolaire



Polaire

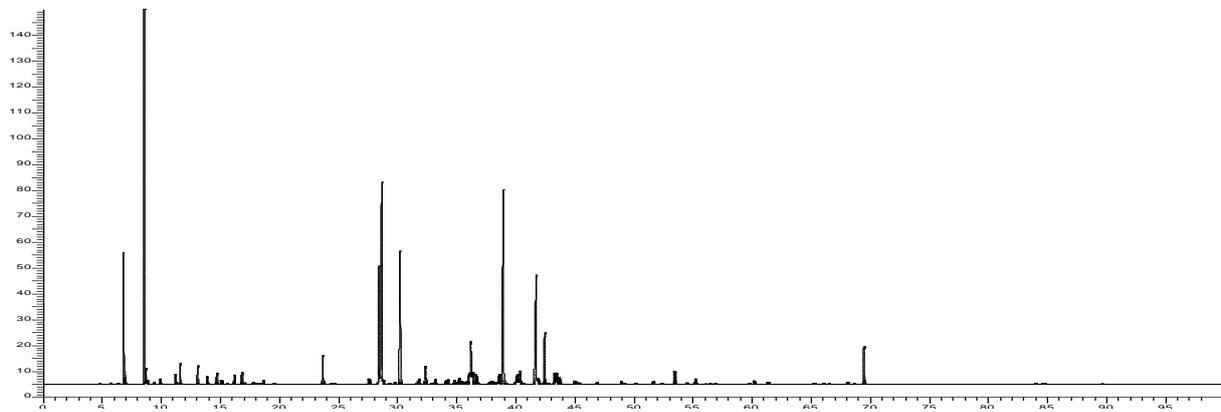


Figure 27 : Chromatogrammes des parties aériennes et des feuilles de *Mentha rotundifolia* sur colonne apolaire et polaire

Tableau 8. Composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*

Composés	Indice de rétention		Huiles essentielles (%)		Mode d'identification
	Ir ^a	Ir ^p	Parties aériennes	Feuilles	
α -Thujène	924	1016	0,2	0,1	Ir
α -Pinène	932	1014	0,6	0,5	Ir, RMN ¹³ C
Camphène	945	1065	0,3	0,2	Ir
Oct-1-en-3-ol	961	1445	0,4	0,4	Ir, RMN ¹³ C
Sabinène	966	1123	1,0	0,8	Ir, RMN ¹³ C
β -Pinène	972	1113	0,5	0,4	Ir, RMN ¹³ C
Myrcène	982	1161	0,9	0,7	Ir, RMN ¹³ C
α -Terpinène	1010	1182	0,4	0,3	Ir
p-Cymène	1013	1271	tr	tr	Ir
Limonène*	1022	1202	0,6	0,6	Ir, RMN ¹³ C
β -Phellandrène *	1022	1210	0,3	tr	Ir, RMN ¹³ C
(Z)- β -Ocimène	1026	1253	0,5	0,5	Ir, RMN ¹³ C
(E)- β -Ocimène	1037	1250	tr	tr	Ir
γ -Terpinène	1050	1246	0,7	0,4	Ir, RMN ¹³ C
Trans-Hydrate de sabinène	1054	1460	8,6	11,6	Ir, RMN ¹³ C
Terpinolène	1080	1283	0,2	0,1	Ir
Cis-Hydrate de sabinène	1084	1542	0,2	0,2	Ir
Acétate d'heptyle	1093	1576	1,8	1,0	Ir, RMN ¹³ C
Menthone	1135	1464	18,1	21,9	Ir, RMN ¹³ C
Isomenthone	1144	1491	10,5	12,4	Ir, RMN ¹³ C
Menthofurane	1149	1482	0,1	tr	Ir
Néo menthol	1151	1592	2,4	3,3	Ir, RMN ¹³ C
Trans-isopulégone	1163	1597	0,9	0,6	Ir, RMN ¹³ C
Myrténal	1169	1627	0,1	0,2	Ir
Carvone dihydro trans	1173	1602	1,2	0,8	Ir, RMN ¹³ C
Cis-carvéol	1207	1880	0,2	0,2	Ir
Pulégone	1216	1643	17,4	15,9	Ir, RMN ¹³ C
Cis-oxyde de pipéritone	1227	1721	1,0	0,8	Ir, RMN ¹³ C
Pipéritone	1227	1729	0,6	0,5	Ir, RMN ¹³ C
Neomenthyl acétate	1261	1527	1,3	1,6	Ir, RMN ¹³ C
Menthol iso	1278	1666	0,3	0,4	Ir
Piperiténone	1310	1915	1,0	1,9	Ir, RMN ¹³ C
Acétate d' α -terpényl	1334	1692	9,3	5,1	Ir, RMN ¹³ C
β -Bourbonène	1385	1518	0,4	0,2	Ir
β -Elémène	1389	1588	0,2	0,2	Ir
(E)- β -Caryophyllène	1419	1591	3,1	3,4	Ir, RMN ¹³ C
Germacrène iso D	1443	1664	0,8	0,8	Ir, RMN ¹³ C
α -Humulène	1459	1668	1,1	1,0	Ir, RMN ¹³ C
Germacrène D	1477	1706	4,1	4,4	Ir, RMN ¹³ C
γ -Cadinène	1507	1755	0,1	0,1	Ir
Cis-calaménène	1511	1827	0,2	0,1	Ir
δ -Cadinène	1515	1753	0,2	0,3	Ir
Total (%)			91,8	93,9	

L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) excepté pour les composés qui sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire ; Ir^a et Ir^p: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) ; Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0,1% sont notés comme traces (tr).

Cette analyse a permis d'identifier 42 composés pour les parties aériennes et les feuilles représentant respectivement 91,8% et 93,9% de la composition totale (**Tableau 9**), elle est marquée par l'importante présence de monoterpènes oxygénés 73,4% pour les parties aériennes et 77,5% pour les feuilles (**Figures 28 et 29**) avec les constituants majoritaires les plus abondants menthone, pulégone et isomenthone qui représentent à eux seuls dans la composition globale 46,0% pour les parties aériennes et 50,2% pour les feuilles, soit 62,7% et 64,8% de la composition en monoterpènes oxygénés respectivement des parties aériennes et des feuilles de *Mentha rotundifolia*. La deuxième classe est celle des sesquiterpènes hydrocarbonés suivie de celle des hydrocarbures monoterpéniques (**Figures 30**). Les composés non identifiés représentent 8,2% dans les parties aériennes et 6,1% dans les feuilles.

Tableau 9. Bilan de l'étude de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)	
	Parties aériennes	Feuilles
Monoterpènes hydrocarbonés	14(6,2)	14(4,6)
Monoterpènes oxygénés	17(73,4)	17(77,5)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	9(10,2)	9(10,5)
Autres	2(2,2)	2(1,4)
	% de composés identifiés	
	91,8	93,9
	% de composés non identifiés	
	8,2	6,1

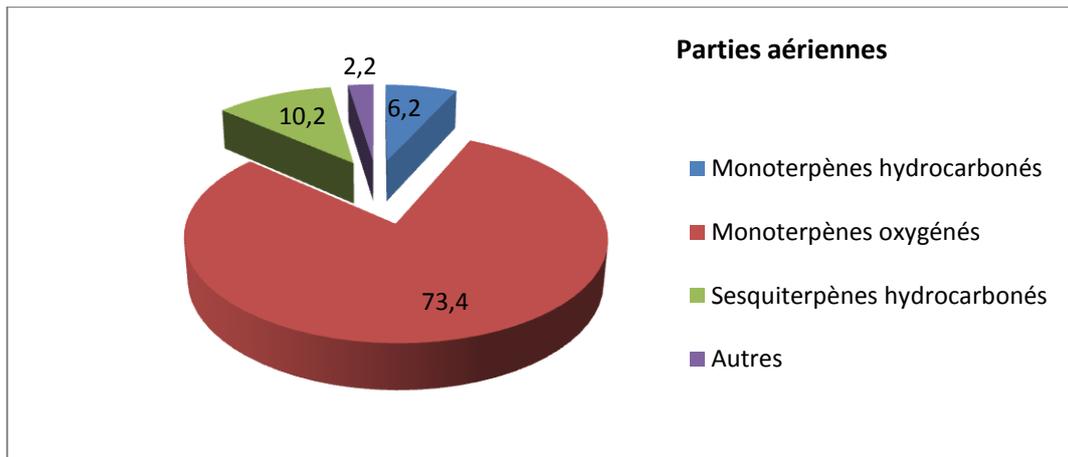


Figure 28 : Composés volatils présents dans les parties aériennes de *Mentha rotundifolia*

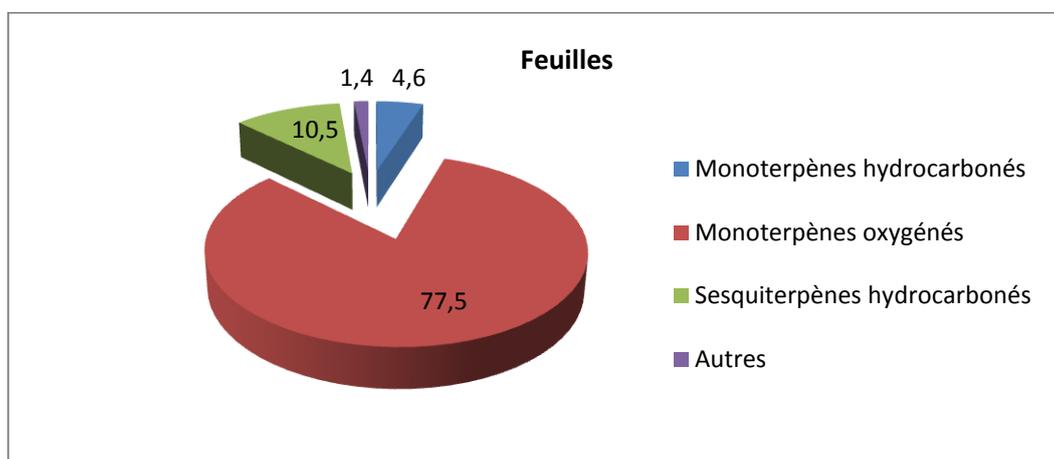


Figure 29 : Composés volatils présents dans les feuilles de *Mentha rotundifolia*

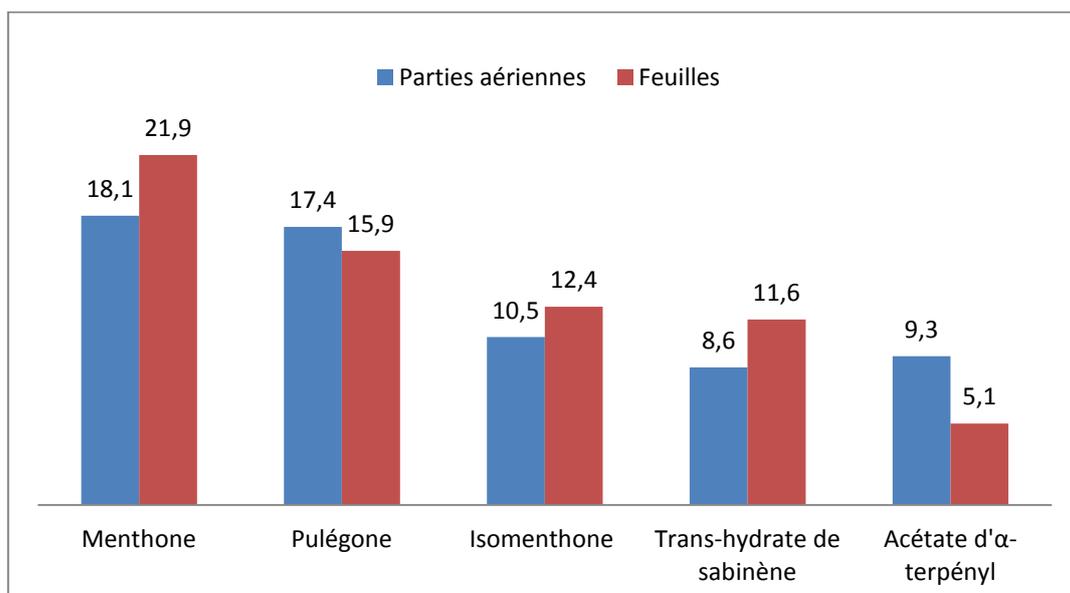


Figure 30 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des parties aériennes et des feuilles de *Mentha rotundifolia*

Les résultats obtenus par l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Mentha rotundifolia* ont été comparés à de nombreux travaux sur la même espèce de diverses origines présentant différents chémotypes et sont toutes riches en constituants monoterpéniques oxygénés, à l'exception de celle de Beja en Tunisie (**Riahi et al., 2013**) qui est riche en sesquitépènes β -caryophyllène (26,67%) et germacrène D (12,31%).

D'autres huiles essentielles du nord de l'Algérie Miliana et Rouina sont riches en oxyde de pipéritone (Miliana : 30,5% ; Rouina : 28,1%) et en oxyde de pipériténone (Miliana : 23,5% ; Rouina : 38,6%) (**Brada et al., 2006**), d'autres résultats relativement similaires ont été obtenus par **Brada et al., 2007**. Celle de l'Uruguay a révélée 80,8% en oxyde de pipériténone (**Lorenzo et al., 2002**). L'oxyde de pipéritone a été rapporté comme constituant majoritaire des huiles essentielles de Grèce (**Kokkini et Papageorgiou, 1988**) et de Tunisie (**Riahi et al., 2013**).

L'étude réalisée par **Sutour et al., 2010**, sur deux espèces de *M. suaveolens* de Corse a révélée la présence de deux constituants majoritaires pipériténone (73,5%) et l'oxyde de pipériténone (72,0%) des résultats similaires sur deux espèces marocaines de deux régions différentes ont été trouvés (**Zekri et al., 2013**).

D'autres travaux portant sur la variation de la composition chimique des huiles volatiles de *M. rotundifolia* ont révélé la présence de chémotypes particuliers et comme constituants majoritaires : l'acétate de menthyle (**Kokkini et Papageorgiou, 1988**), le 6-*p*-menthatrièn-2,3-diol (14,5%) et le germacrène D (12,4%) (**Pino et al., 1999**), le menthol à 40,5% (**Derwich et al., 2010**).

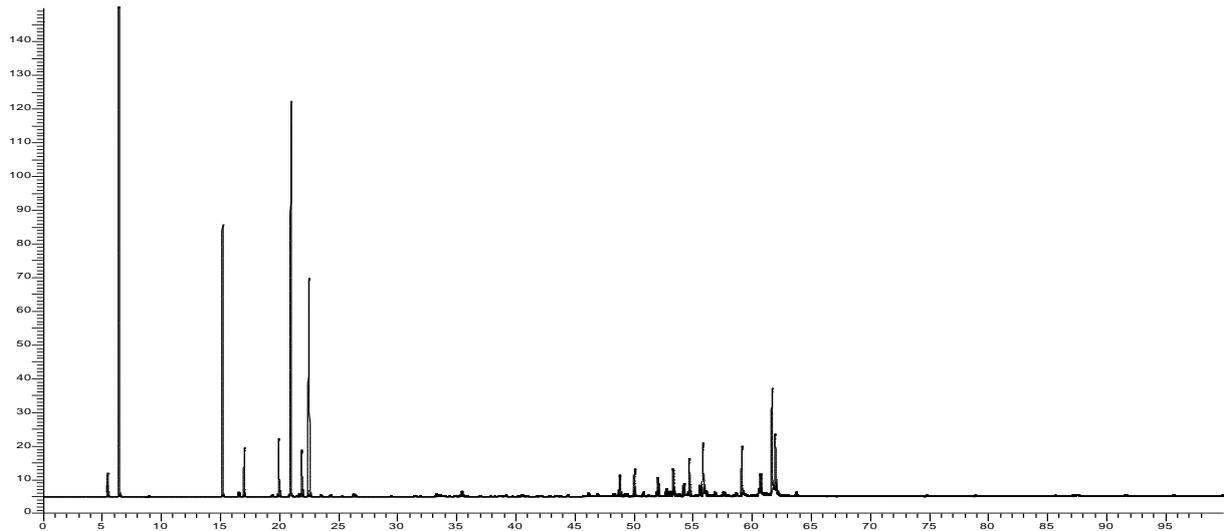
La pulégone a été présente à 85,47% dans l'huile volatile marocaine de l'hybride *rotundifolia* (*M. suaveolens* x *M. longifolia*) (**El Arch et al., 2003**), alors qu'on l'a retrouvé dans celle de Tunisie à 32,09% (**Riahi et al., 2013**), ceci a déjà été trouvé auparavant (**Idrissi et Bellakhdar, 1989**). En effet cette cétone qui est notamment le constituant principal de *Mentha pulegium* L. (**Bruneton, 1993**) est aussi reportée dans de fortes proportions pour deux échantillons de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (**Ouzmil et al., 2002**).

La variabilité de la composition constatée sur les huiles essentielles est vraisemblablement en rapport avec des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol sans oublier la période de récolte.

II.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus molle*

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des fruits de la plante *Schinus molle* est donnée dans le **tableau 10**, leurs chromatogrammes sont représentés sur les **figures 31, et 32**, les spectres RMN¹³C sont caractérisés par un certains nombre de raies de résonance (**Annexe F**).

Fe SM Apol



Fe SM pol

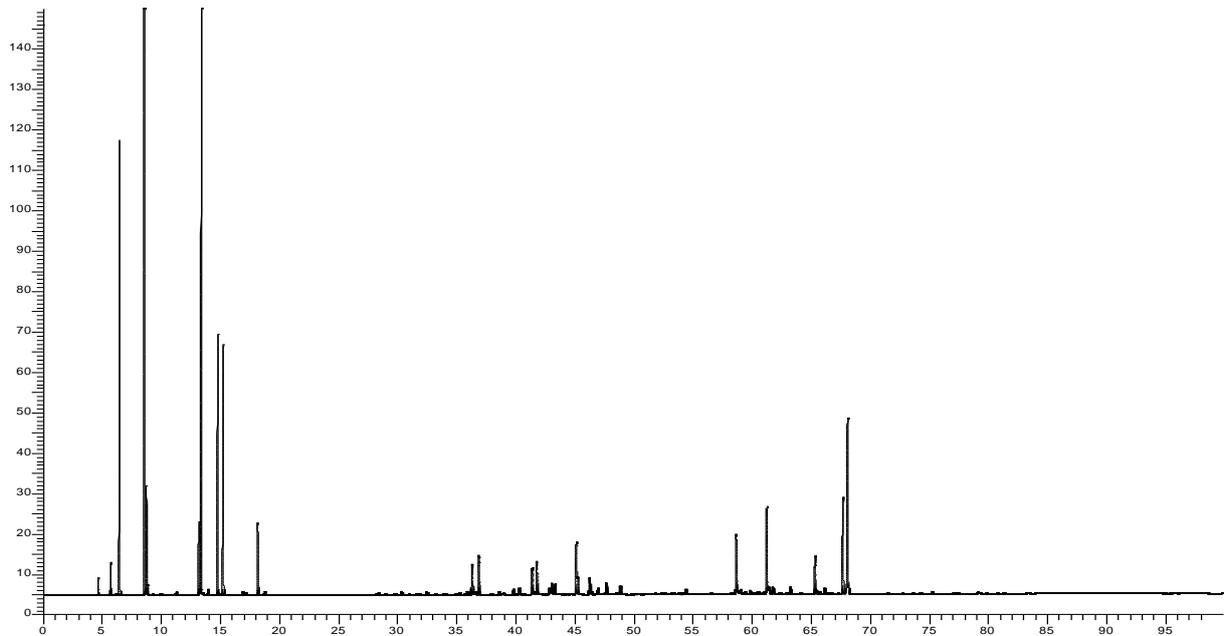
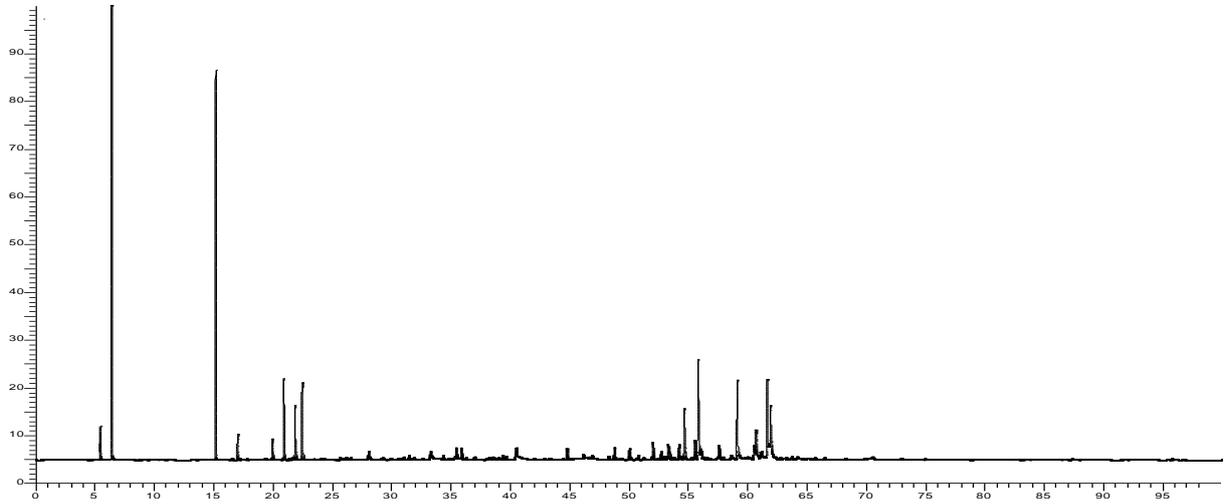


Figure 31 : Chromatogrammes des feuilles de *Schinus molle* sur colonne apolaire et polaire

Fr SM Apol



Fr SM Pol

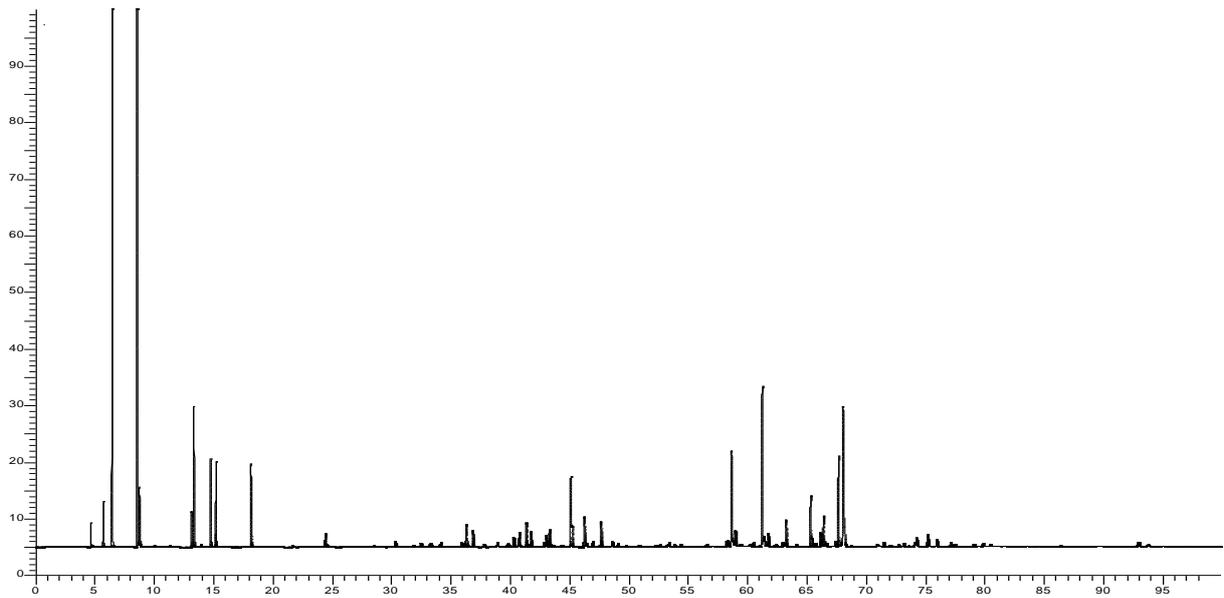


Figure 32 : Chromatogrammes des fruits de *Schinus molle* sur colonne apolaire et polaire

Tableau 10. Composition chimique des huiles essentielles de *Schinus molle*

Composés	Indice de rétention		Huiles essentielles (%)		Mode d'identification
	Ir ^a	Ir ^p	Feuilles	Fruits	
α -Thujène	922	1013	0,2	0,1	Ir, SM
α -Pinène	930	1011	2,7	1,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Camphène	943	1065	tr	0,1	Ir, SM
β -Pinène	970	1113	0,1	0,1	Ir, SM
Myrcène	980	1161	3,3	1,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Phellandrène	997	1167	26,7	6,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinène	1009	1182	0,2	0,1	Ir, SM
<i>p</i> -Cymène	1011	1271	2,8	4,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène*	1021	1202	9,7	3,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène*	1021	1211	9,5	4,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Terpinène	1048	1246	0,1	0,1	Ir, SM
Terpinolène	1078	1283	0,1	0,1	Ir, SM
Linalol	1081	1542	-	tr	Ir, SM, RMN ¹³ C
Cis-hydrate sabinène	1082		-	0,1	Ir, SM
Camphre	1122	1528	tr	0,3	Ir, SM
Terpinèn-4-ol	1161	1600	-	0,2	Ir, SM
Carvotanacétone	1219	1674	-	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
2-undécanone	1266		tr	0,1	Ir, SM
Thymol	1268	2195	0,1	tr	Ir, SM
α -Copaène	1375	1491	0,2	0,4	Ir, SM
β -Elémène	1387	1587	0,1	0,3	Ir, SM
α -Gurjunène	1409	1524	0,1	0,3	Ir, SM
(E)- β -Caryophyllène	1417	1594	1,5	1,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
Aromadendrène	1437	1604	1,9	1,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Humulène	1449	1665	0,3	0,4	Ir, SM
Allo-aromadendrène	1467	1640	0,2	0,2	Ir, SM
β -Sélinène	1480	1715	0,5	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Muuroolène	1469	1684	1,4	1,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Germacrène D	1485	1711	0,5	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Undecyl acétate	1490	1774	2,1	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Bicyclogermacrène	1492	1720	0,1	0,6	Ir, SM
γ -Cadinène	1505	1755	1,0	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Calamenène	1508	1828	0,1	0,4	Ir, SM
δ -Cadinène	1513	1753	2,6	4,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Elémol	1533	2071	4,2	10,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Spathuléol	1563	2113	0,4	1,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Eudesmol	1617	2158	1,7	2,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Eudesmol	1634	2218	9,3	9,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Eudesmol	1639	2209	5,6	6,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total (%)			89,3	68,6	

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) excepté pour les composés qui sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire; Ir^a et Ir^p: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) ; Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0,1 % sont notés comme traces (tr).

Les résultats de cette analyse varient quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée. Cette étude a permis d'identifier 35 composés représentant 89,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, et 39 pour les fruits (68,6%) (**Tableau 11**). Cette analyse est marquée par l'importante présence de monoterpènes hydrocarbonés 55,4% pour les feuilles suivi par les sesquiterpènes oxygénés 21,2% (**Figures 33, 34 et 35**). A l'inverse les fruits sont représentés par un pourcentage plus élevé de sesquiterpènes oxygénés (30,5%) suivi de 22,3% d'hydrocarbures monoterpéniques puis de 13,6% de sesquiterpènes hydrocarbonés. Les composés non identifiés sont de 10,7% dans les feuilles et 31,4% dans les fruits.

Tableau 11. Bilan de l'étude de l'huile essentielle de *Schinus molle*

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)	
	Feuilles	Fruits
Monoterpènes hydrocarbonés	12(55,4)	12(22,3)
Monoterpènes oxygénés	2(0,1)	6(1,6)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	14(10,5)	14(13,6)
Sesquiterpènes oxygénés	5(21,2)	5(30,5)
Autres	2(2,1)	2(0,6)
	% de composés identifiés	
	89,3	68,6
	% de composés non identifiés	
	10,7	31,4

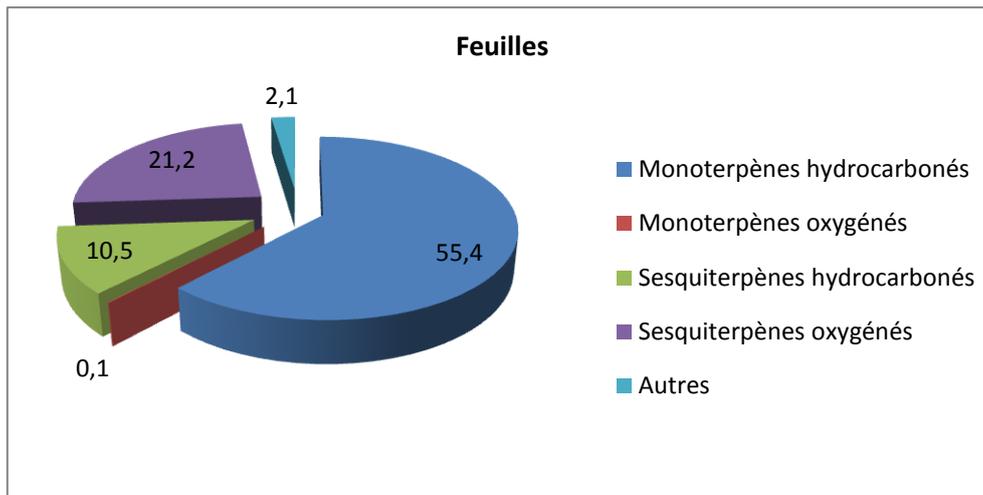


Figure 33 : Composés volatils présents dans les feuilles de *Schinus molle*

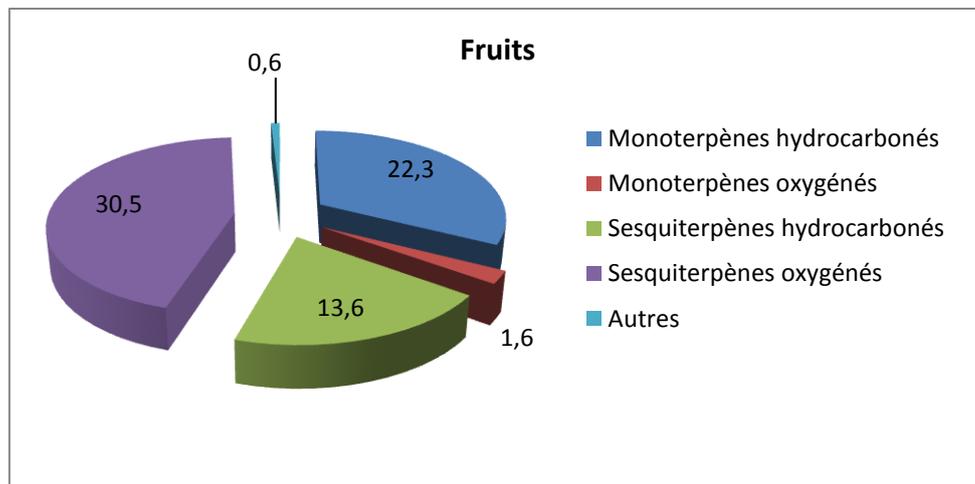


Figure 34 : Composés volatils présents dans les fruits de *Schinus molle*

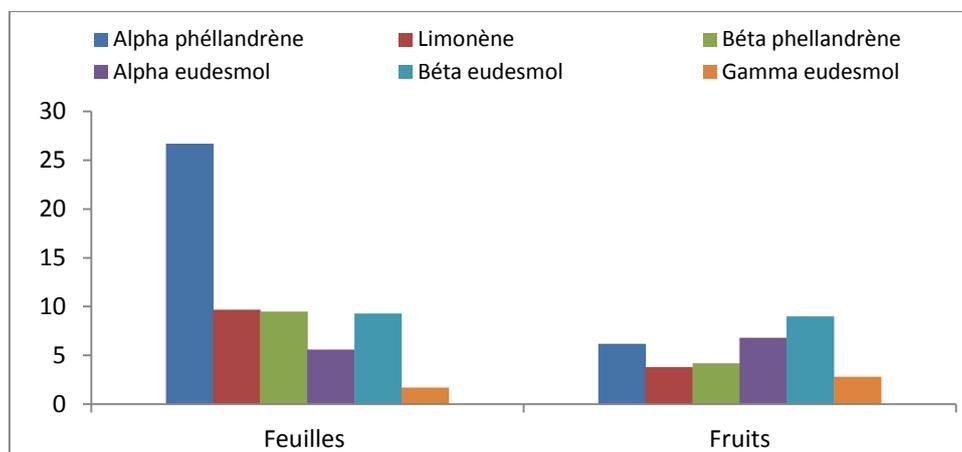


Figure 35 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des feuilles et des fruits de *Schinus molle*

Les résultats obtenus par l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Schinus molle* sont comparables à ceux obtenus par **Belhamel et al., 2008 (Tableau 12)** pour la même partie de la plante, à savoir les feuilles et environ la même période de récolte. Par ailleurs, pour l'ensemble des travaux, l' α -phellandrène est le constituant présent en quantité importante sauf dans les huiles de Costa Rica (**Díaz et al., 2008**) où les constituants majoritaires sont l' α -pinène (22,7%) et le β -pinène (31,1%) alors que celle de l'Arabie Saoudite est riche en *p*-cymène (69,3%) (**Abdel-Sattar et al., 2010**). Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle des fruits est différente de celle des autres travaux. **Rossini et al. (1996)** ont rapporté que cette plante est caractérisée par l'abondance de bicyclogermacrène (29,2%), constituant non identifié comme prépondérant dans les huiles des autres pays. Cette différence dans la composition chimique est sans aucun doute liée aux conditions environnementales, au stade de maturité et à la période de récolte.

Tableau 12. Comparaison de teneurs en composés majoritaires de nos échantillons avec celles de la littérature

Partie de la plante étudiée	Constituants majoritaires en (%)	Région	Période de récolte	Références bibliographiques
<i>Schinus molle</i> feuilles	Bicyclogermacrène (29,2)	Uruguay	Mars	Rossini et al., 1996
<i>Schinus molle</i> feuilles	<ul style="list-style-type: none"> • α-phellandrène (38,1) 	Turquie	Octobre	Baser et al., 1997
<i>Schinus molle</i> fruits	<ul style="list-style-type: none"> • α-phellandrène (22,1) 			
<i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (26,1) ; β -phellandrène (21,0)	Sardaigne	-	Marongiu et al., 2004
<i>Schinus molle</i> feuilles	<ul style="list-style-type: none"> • α-phellandrène (39,72) 	Egypte	-	Ibrahim et al., 2004
<i>Schinus molle</i> fruits	<ul style="list-style-type: none"> • β-phellandrène (23,4) 			

<i>Schinus molle</i> fruits	Myrcène (42,0) ; α -phellandrène (25) ; limonène (19,0) ; β -phellandrène (9,7)	Pérou	-	Huaman et al., 2004
<i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (26,5%) ; limonène (8,6%) ; β -phellandrène (12,4%) ; élémol (10,8%) ; α -eudesmol (6,1%)	Algérie Béjaia	Mai	Belhamel et al., 2008
<i>Schinus molle</i> feuilles	α -pinène (22,7) ; β -pinène (31,1)	Costa rica	Juin	Díaz et al., 2008
<i>Schinus molle</i> fruits	α -phellandrène (35,86) ; β -phellandrène (29,3) ; β -pinène (15,68)	Tunisie	Juillet	Hayouni et al., 2008
<i>Schinus molle</i> feuilles	• <i>p</i> -cymène (69,3)	Arabie saoudite	Avril	Abdel-Sattar et al., 2010
<i>Schinus molle</i> fruits	• <i>p</i> -cymène (32,8) ; β -pinène (19,0) ; α -terpinène (18,29)			
<i>Schinus molle</i> feuilles	• α -phellandrène (25,9)	Portugal	Automne	Martins et al., 2014
<i>Schinus molle</i> fruits	• β -myrcène (51,3)			
<i>Schinus molle</i> feuilles	• α -phellandrène (26,7) ; limonène (9,7) ; β -phellandrène (9,5)	Tlemcen	Novembre	Nos travaux, 2014
<i>Schinus molle</i> fruits	• β -élémol (10,2) ; β -eudesmol (9,0) ; α -eudesmol (6,8) ; α -phellandrène (6,2)			

Chapitre 3 : Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des différents extraits de plantes

I. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

Pour mieux comprendre l'activité de nos espèces végétales, nous nous sommes intéressés aux propriétés antioxydantes de leurs extraits. En effet, l'activité antioxydante semble être le principe d'action d'un certain nombre de produits pharmaceutiques. Étant donné qu'aucune méthode normalisée pour la détermination des propriétés antioxydantes des extraits de végétaux ne peut être établie, il est fortement recommandé d'utiliser plusieurs tests pour l'évaluation de la capacité antioxydante des plantes. A travers notre étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas, ni pour caractériser la tendance naturelle antioxydante aussi bien *in vitro* que *in vivo*, ni pour donner une précision complète de l'efficacité antioxydante. Dans cette étude, quatre tests d'évaluation couramment utilisés dans notre équipe, la capacité antioxydante totale, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer, et le blanchiment du β -carotène, sont utilisés à cet effet, ceci permettra de mieux généraliser les résultats.

I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des différents extraits des espèces végétales étudiées est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide ascorbique comme référence (**Figure 36**).

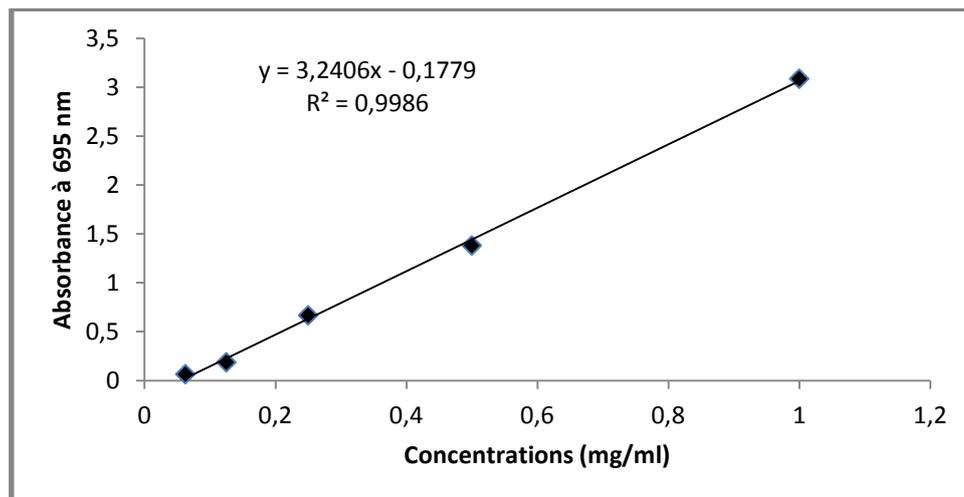
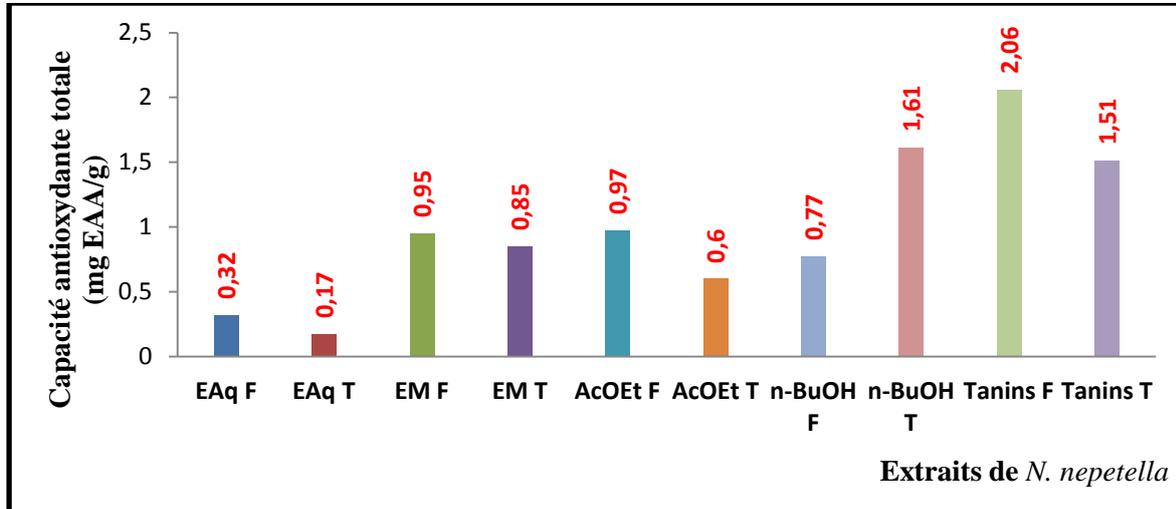


Figure 36 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la mesure de la capacité antioxydante totale

a. Extraits de *Nepeta nepetella*

La **figure 37** montre que tous les extraits de *N. nepetella* présentent des activités antioxydantes différentes, l'extrait des tanins des feuilles exhibe la meilleure valeur de l'ordre de 2,06 mg EAA/g MS.



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 37 : Capacité antioxydante totale des extraits de *N. nepetella*

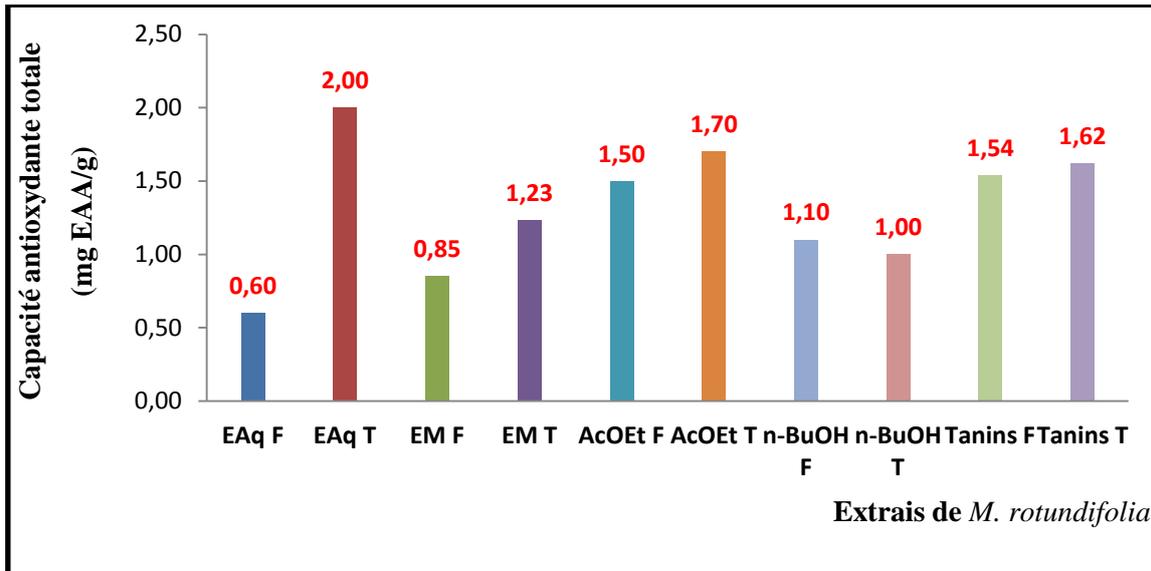
La classification des différentes parties et extraits de la plante *N. nepetella* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante :

Tanins F > n-BuOH T > tanins T > AcOEt F > EM F > EM T > n-BuOH F > AcOEt T > EAq F > EAq T.

b. Extraits de *Mentha rotundifolia*

Nous constatons que pour les extraits de *M. rotundifolia*, l'activité antioxydante varie de 0,60 à 2,00 mg EAA/g MS. L'extrait aqueux des tiges présente l'activité la plus élevée, soit : 2,00 mg EAA/g MS (**Figure 38**).

Par ailleurs, l'extrait aqueux et la fraction acétate d'éthyle des tiges présentent une meilleure capacité antioxydante totale dans *M. rotundifolia* que *N. nepetella*, deux espèces de la même famille (Lamiacées). Aussi les extraits de tanins des deux espèces sont relativement proches pour les tiges.



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 38 : Capacité antioxydante totale des extraits de *M. rotundifolia*

La classification des différentes parties et extraits de la plante *M. rotundifolia* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante :

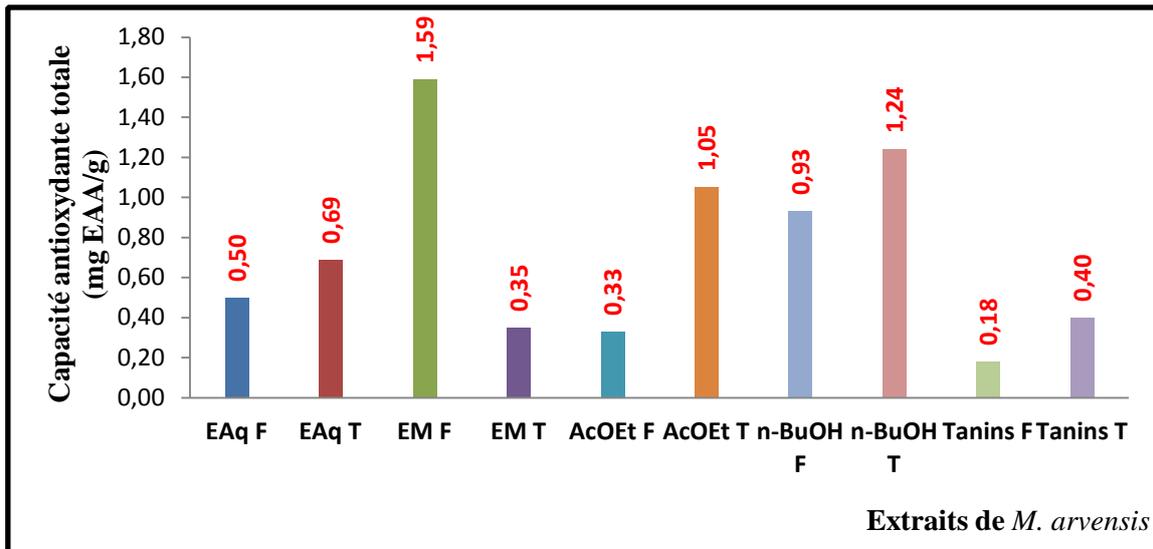
EAq T > AcOEt T > tanins T > Tanins F > AcOEt F > EM T > n-BuOH F > n-BuOH T > EM F > EAq F.

c. Extraits de *Moricandia arvensis*

Les résultats montrent que l'activité antioxydante totale de l'extrait méthanolique des feuilles de *M. arvensis* est la plus forte comparée aux autres extraits de la plante (**Figure 39**). Parmi eux, l'extrait des tanins enregistre la plus faible valeur, de l'ordre de 0,18 mg EAA/g MS.

La classification des différentes parties et extraits de la plante *M. arvensis* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante :

EM F > n-BuOH T > AcOEt T > n-BuOH F > EAq T > EAq F > Tanins T > EM T > AcOEt F > Tanins F.



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 39 : Capacité antioxydante totale des extraits de *M. arvensis*

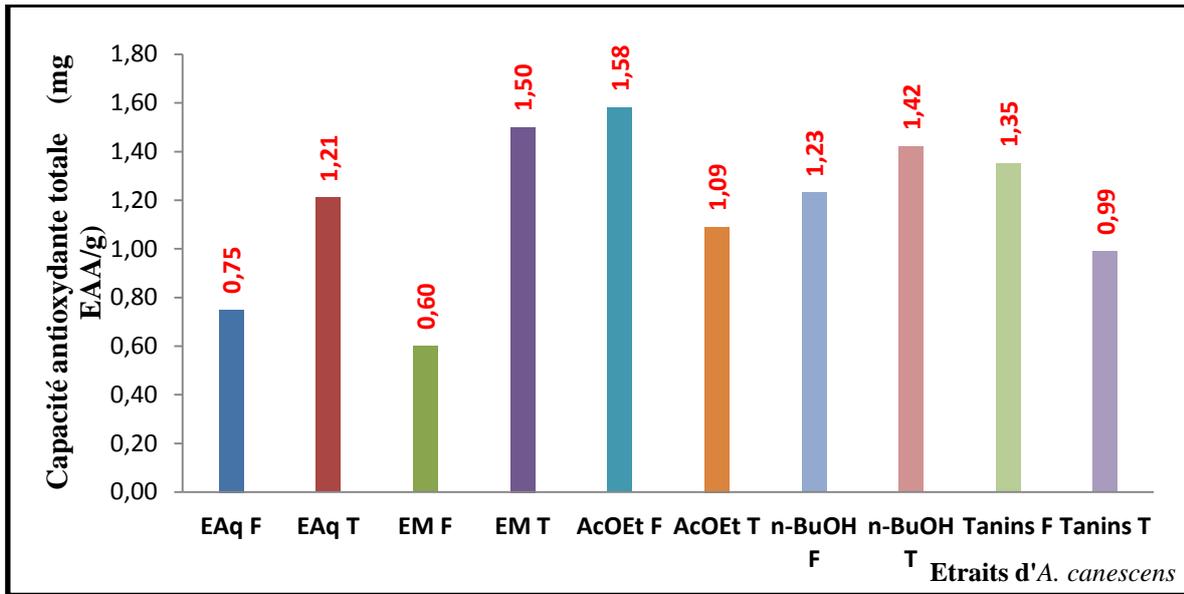
d. Extraits d'*Atriplex canescens*

La **figure 40** illustre l'activité antioxydante totale des différents extraits d'*A. canescens*, nous constatons que la fraction acétate d'éthyle des feuilles et l'extrait méthanolique des tiges ont des activités voisines avec des valeurs de l'ordre de 1,58 et 1,50 mg EAA/g MS respectivement.

L'extrait méthanolique des feuilles reste l'extrait le moins actif à raison de 0,60 mg EAA/g MS.

La classification des différentes parties et extraits de la plante *A. canescens* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante :

AcOEt F > EM T > n-BuOH T > Tanins F > n-BuOH F > EAq T > AcOEt T > tanins T > EAq F >> EM F.

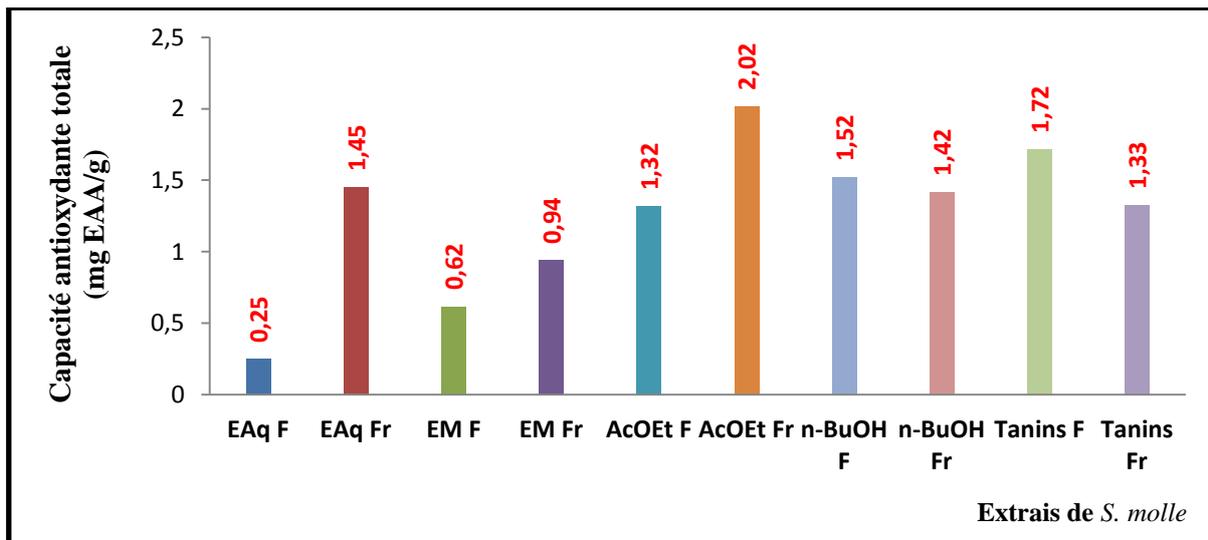


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 40 : Capacité antioxydante totale des extraits d'*A. canescens*

e. Extraits de *Schinus molle*

Les résultats des différents extraits testés de *S. molle* montrent que la fraction acétate des fruits présente une capacité antioxydante totale de l'ordre de 2,02 mg EAA/g MS, suivi de l'extrait des tanins des feuilles 1,72 mg EAA/g. L'extrait aqueux des feuilles montre la plus faible activité avec une valeur de l'ordre de 0,25 mg EAA/g (Figure 41).



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq Fr : Extrait aqueux fruits ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM Fr : Extrait méthanolique fruits ; AcO Et F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcO Et Fr : Fraction acétate d'éthyle fruits ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH Fr : Fraction n-butanol fruits ; F : Feuilles ; Fr : Fruits.

Figure 41 : Capacité antioxydante totale des extraits de *Schinus molle*

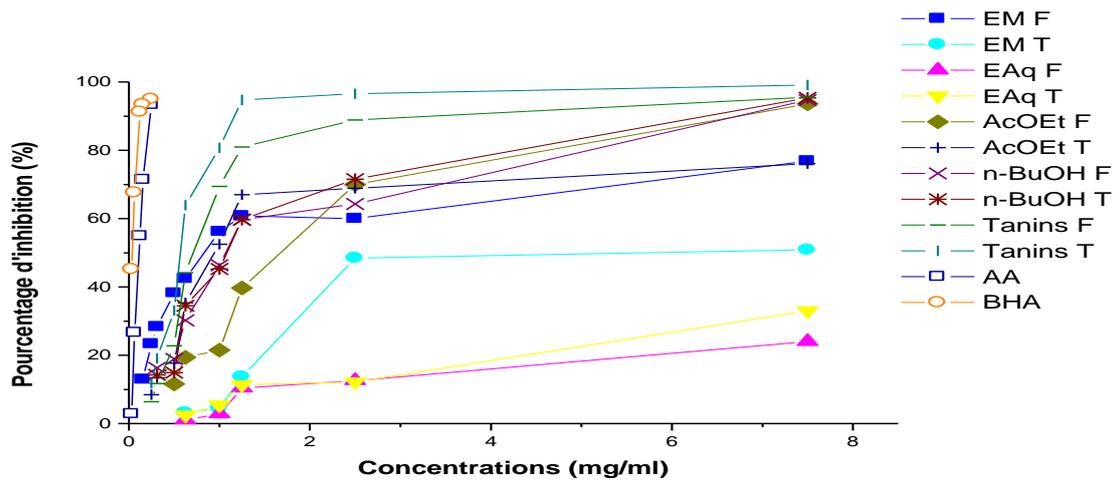
A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante totale des extraits de ces cinq espèces végétales. Pour cela, il est difficile, voir impossible de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs.

I.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

a. Extraits de *Nepeta nepetella*

Parmi les dix extraits étudiés de *N. nepetella*, ceux des tanins sont les plus actifs, leurs IC₅₀ est de l'ordre de 0,41±0,30 mg/ml pour les tiges et de 0,57±0,87 mg/ml pour les feuilles (Figure 42).

L'extrait des tanins des tiges a montré un pouvoir antiradicalaire plus important par rapport aux autres extraits. A une concentration de 0,55 mg/ml, il a atteint un pourcentage d'inhibition de 60,00%, alors que les autres extraits présentent de faibles pourcentages à cette même concentration allant de 2,17% pour l'extrait aqueux des feuilles jusqu'à 40,42% pour l'extrait des tanins des feuilles.



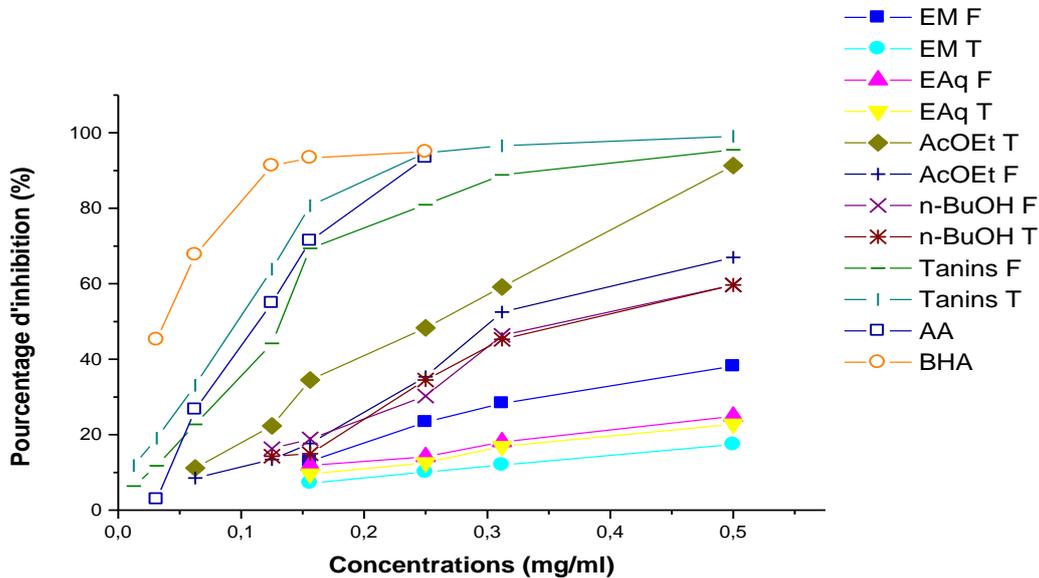
EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 42 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de *N. nepetella*

b. Extraits de *Mentha rotundifolia*

L'extrait des tanins des tiges présente à 0,25 mg/ml un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 94,34%, l'extrait des tanins des feuilles lui aussi présente un très bon pourcentage d'inhibition à cette même concentration, soit : 81,35% (Figure 43).

Les extraits bruts méthanolique et aqueux des tiges se montrent les plus faibles avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 10,43% et 12,82% respectivement.

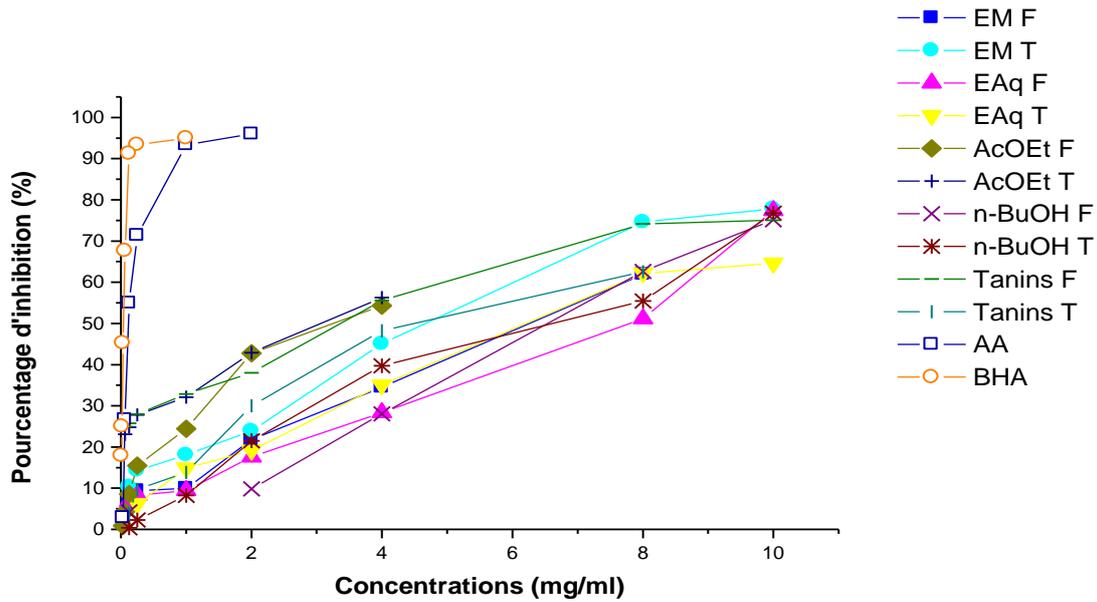


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de *M. rotundifolia*

c. Extraits d'*Atriplex canescens*

Nous remarquons sur la **figure 44** qu'à la concentration de 1 mg/ml les tanins des feuilles et la fraction acétate d'éthyle des tiges enregistrent le pourcentage d'inhibition le plus élevé (32,88% ; 32,12 % respectivement) suivi par la fraction acétate d'éthyle des feuilles (24,40%), l'extrait des tanins des tiges (13,84%), la fraction butanolique des tiges (8,24%), alors qu'à la même concentration, les autres extraits présentent des pourcentages faibles.

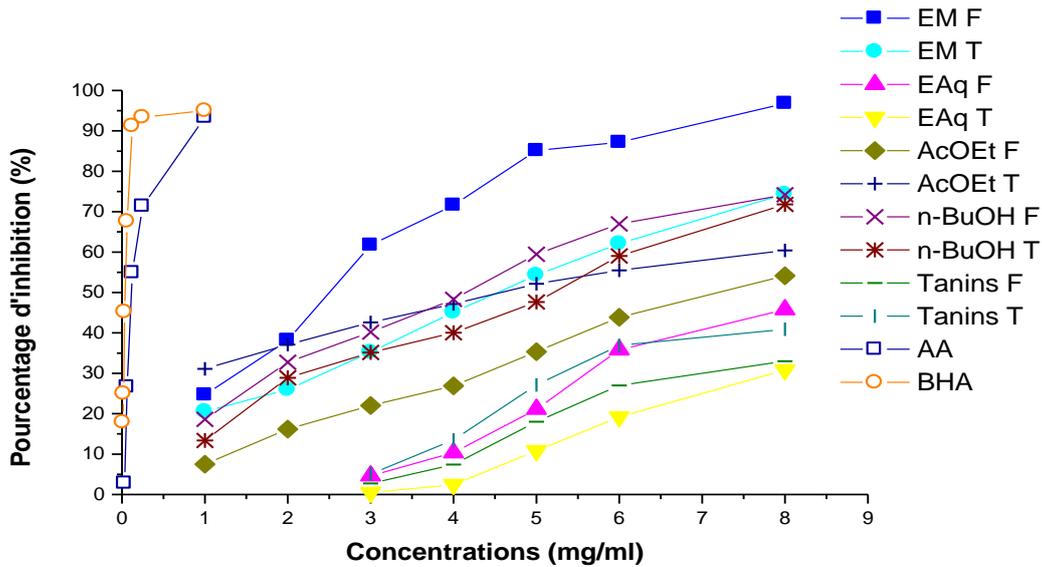


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 44 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits d'*Atriplex canescens*

d. Extraits de *Moricandia arvensis*

D'après la **figure 45** nous remarquons à la concentration 2 mg/ml, l'extrait brut méthanolique des feuilles enregistre le pourcentage d'inhibition le plus élevé (38,77%) suivi par la fraction acétate d'éthyle des tiges (37,10%), les fractions n-butanol des feuilles (32,79 %) et des tiges (28,98 %), de l'extrait méthanolique des tiges (25,72%), alors qu'à la même concentration, les autres extraits présentent des pourcentages d'inhibition faibles.

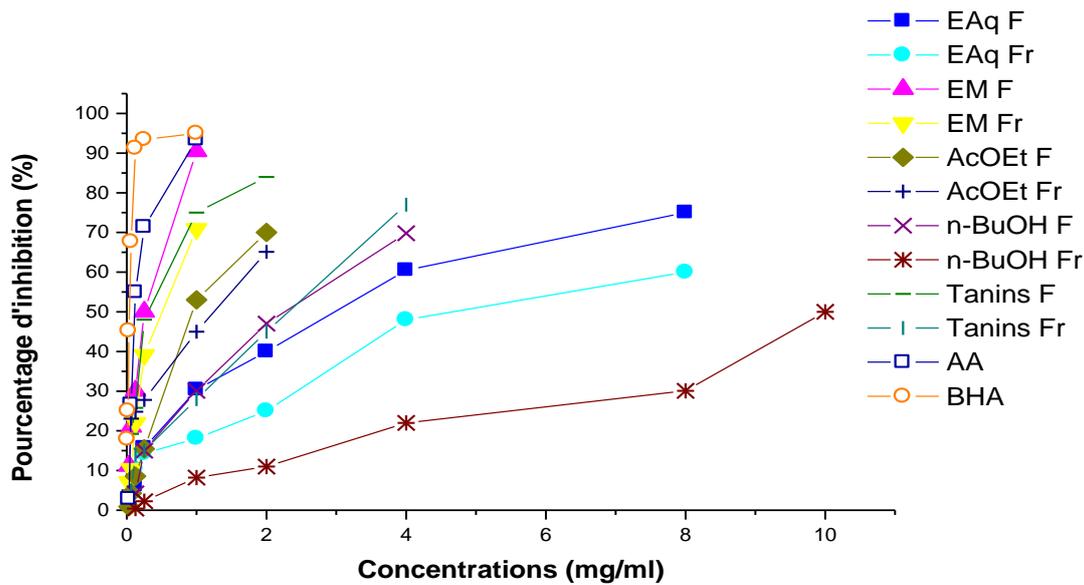


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 45 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de *Moricandia arvensis*

e. Extraits de *Schinus molle*

La **figure 46** montre qu'à la concentration 1 mg/ml, l'extrait brut méthanolique des feuilles enregistre le pourcentage d'inhibition le plus élevé (90,94%) suivi par l'extrait des tanins des feuilles (74,50%), l'extrait brut méthanolique des fruits (70,83%), la fraction acétate d'éthyle des feuilles (53,69%), alors qu'à la même concentration, les autres extraits présentent des pourcentages faibles.



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq Fr : Extrait aqueux fruits ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM Fr : Extrait méthanolique fruits ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt Fr : Fraction acétate d'éthyle fruits ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH Fr : Fraction n-butanol fruits ; F : Feuilles ; Fr : Fruits.

Figure 46 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des différents extraits de *Schinus molle*

A l'instar de la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante totale, les résultats concernant l'activité antiradicalaire mettent en évidence une grande variabilité entre les différentes espèces. En effet, le **tableau 13** montre que les concentrations d'inhibition à 50% (IC_{50}) de l'ensemble des extraits étudiés varient de $0,08 \pm 0,02$ à $15,73 \pm 0,18$ mg/ml pour l'extrait des tanins des tiges de *M. rotundifolia* et l'extrait des tanins des feuilles de *M. arvensis* respectivement.

L'extrait des tanins des tiges de *M. rotundifolia* est le plus actif avec une meilleure activité du piégeage du radical DPPH supérieure au témoin (acide ascorbique $0,12 \pm 0,08$ mg/ml) de l'ordre de $0,08 \pm 0,02$ mg/ml suivi des feuilles de $0,12 \pm 0,00$ mg/ml du même extrait.

Parmi les autres extraits de *Mentha rotundifolia*, les extraits acétate d'éthyle l'extrait des tiges et feuilles sont les plus actifs, leur IC_{50} sont de l'ordre de $0,32 \pm 0,02$ mg/ml et $0,37 \pm 0,02$ mg/ml, respectivement, suivi de l'extrait n-butanol des tiges avec une IC_{50} de l'ordre de $0,48 \pm 0,03$ mg/ml. Alors que, les extraits méthanolique et aqueux présentent des IC_{50} plus élevées donc moins actifs en comparaison aux standards acide ascorbique et BHA.

Tableau 13. Valeurs des IC₅₀ des différents extraits des cinq espèces végétales étudiées

Extraits des plantes		IC ₅₀ DPPH (mg/ml)				
		EAq	EM	AcOEt	n-BuOH	Tanins
<i>Nepeta nepetella</i> (Lamiacées)	Feuilles	10,43±0,61	1,45 ± 0,07	0,57±0,87	0,90±0,11	0,41±0,3
	Tiges	20,16±0,23	7,37±0,17	1,40±0,54	1,32±0,57	0,80±0,11
<i>Mentha rotundifolia</i> (Lamiacées)	Feuilles	1,01±0,01	0,70 ± 0,03	0,37±0,02	0,64±0,04	0,12±0,00
	Tiges	1,07±0,01	1,38±0,02	0,32±0,02	0,48±0,03	0,08±0,02
<i>Moricandia arvensis</i> (Brassicacées)	Feuilles	11,89±0,30	1,82±0,11	7,30±0,13	4,65±0,34	15,73±0,18
	Tiges	9,05±0,78	4,4±0,29	4,83±0,18	5,32±0,26	13,65±0,22
<i>Atriplex canescens</i> (Amaranthacées)	Feuilles	4,14±0,19	4,56±0,08	0,73±0,03	2,20±0,29	3,37±0,04
	Tiges	5,71±0,30	6,44±0,19	2,31±0,26	2,84±0,19	4,12±0,03
<i>Schinus molle</i> (Anacardiacees)	Feuilles	2,74±0,19	0,25±0,61	0,90±0,03	2,8±0,00	0,30±0,05
	Fruits	4,87±0,46	0,43±0,15	1,50±0,07	10,0±0,1	2,60±0,11
Acide ascorbique		0,12±0,08				
BHA		0,09±0,03				

Les fractions tanins, acétate d'éthyle ainsi que la fraction butanolique ont montré pour les deux lamiacées une bonne activité antioxydante en comparaison avec les extraits bruts aqueux et méthanoliques.

Parmi les extraits des feuilles de *Moricandia arvensis*, l'extrait méthanolique représente l'extrait le plus actif, son IC₅₀ est de 1,82±0,11 mg/ml, suivi de l'extrait butanolique, l'extrait acétate d'éthyle, et l'extrait aqueux avec des IC₅₀ de l'ordre de 4,65±0,34, 7,30±0,13 et 11,89±0,30 mg/ml, respectivement. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'extrait des tanins avec une IC₅₀ de l'ordre de 15,73±0,18 mg/ml. Pour les extraits des tiges, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique s'est montrée plus forte que celle de la fraction acétate d'éthyle, l'extrait butanolique et l'extrait aqueux quant à eux, sont plus actifs que celui des tanins. En comparaison avec les standards AA, BHA, on remarque que l'ensemble des extraits testés se sont avérés moins actifs.

Pour *Atriplex canescens*, la fraction acétate d'éthyle des feuilles s'avère la plus active (IC₅₀ = 0,73±0,03 mg/ml). En comparant les IC₅₀ des différents extraits de *Schinus molle*,

l'extrait méthanolique des feuilles se montre le plus actif, suivi de l'extrait des tanins du même organe ($IC_{50} = 0,25 \pm 0,61$ mg/ml et $IC_{50} = 0,30 \pm 0,05$ mg/ml respectivement), mais qui reste néanmoins moins actifs que les antioxydants de synthèse.

I.3. Méthode de la réduction de fer (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie et Strain, 1996**). Il est universel, peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Li et al., 2008**).

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

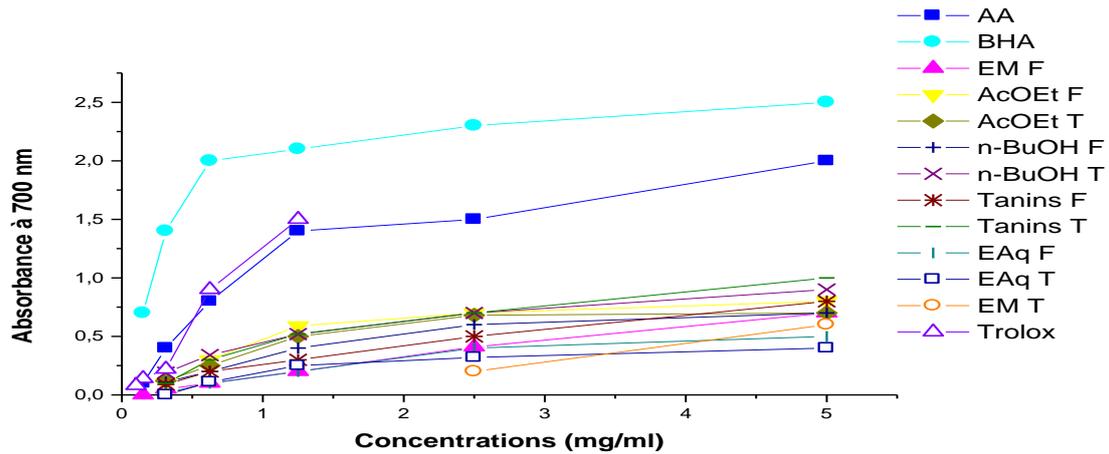
En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (**Amarowicz et al., 2004**).

Quelques études ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004 ; Kumaran et Karunakaran, 2007**).

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de chaque partie des différentes plantes étudiées. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats obtenus corroborent avec le fait que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (**Ozturk et al., 2007 ; Liu et al., 2009**).

a. Extraits de *Nepeta nepetella*

Les résultats obtenus dans la **figure 47**, démontrent la capacité de réduction de fer. Les différents extraits présentent une faible activité comparés aux contrôles positifs (AA, BHA et Trolox). A une concentration de 1,25 mg/ml, nous constatons que la fraction acétate d'éthyle des feuilles détient le meilleur pouvoir réducteur avec une DO égale à 0,59 suivi de l'extrait des tanins des tiges (DO=0,54), la fraction n-butanol des tiges (DO=0,52), la fraction acétate d'éthyle des tiges (DO=0,5). Le reste des extraits a montré une faible capacité à réduire le fer.

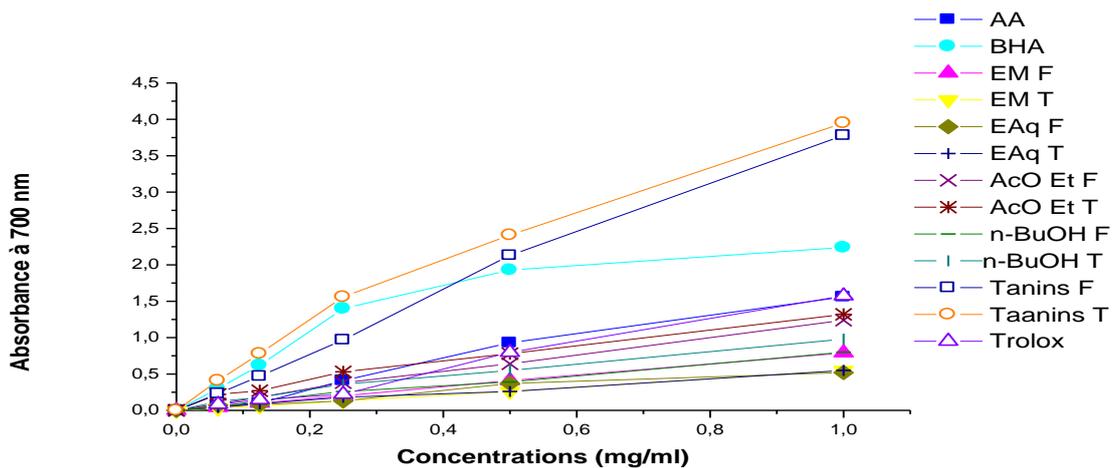


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 47 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce de *Nepeta nepetella*

b. Extraits de *Mentha rotundifolia*

Les résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait en tanins des deux parties de *Mentha rotundifolia* est largement supérieur par rapport aux autres extraits, et même à celui de l'acide ascorbique, du BHA et du Trolox. A la concentration de 0,5 mg/ml l'extrait en tanins possède une forte puissance de réduction de fer (**Figure 48**).



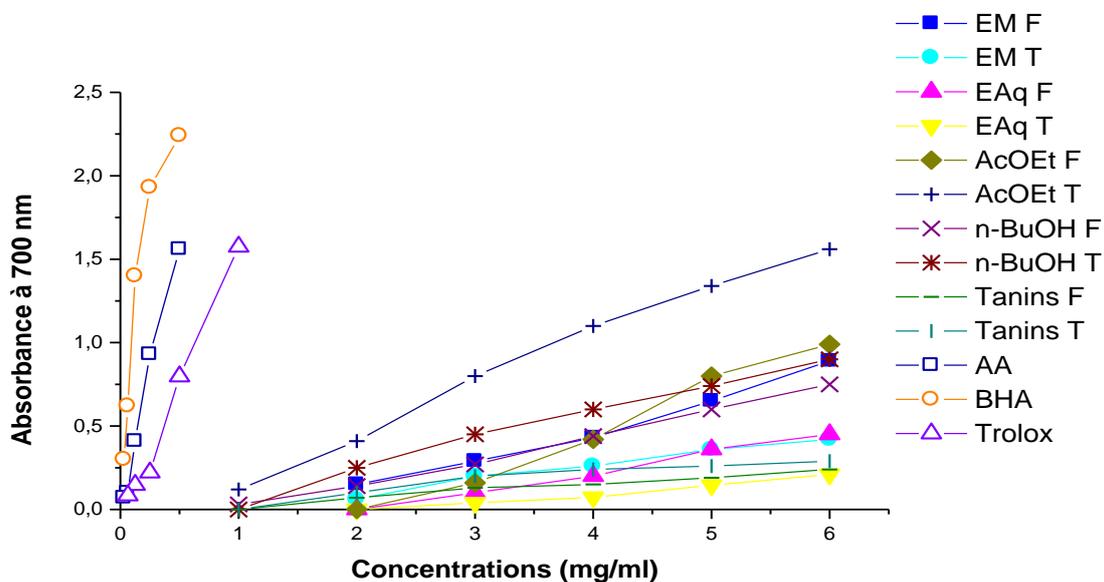
EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcO Et F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcO Et T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-but F : Fraction n-butanol feuilles ; n-but T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 48 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce de *Mentha rotundifolia*

c. Extraits de *Moricandia arvensis*

La **figure 49** montre que la fraction acétate d'éthyle des tiges présente une DO = 1,56 à une concentration de l'ordre de 6,0 mg/ml. Nous remarquons aussi que l'extrait acétate d'éthyle des feuilles est moins actif que celui des tiges (0,99), à la même concentration.

D'après la **figure 49**, nous constatons que l'extrait aqueux des tiges possède une faible action vis-vis de Fe^{3+} présent dans la solution (DO = 0,45, [c] = 6,0 mg/ml) par rapport aux feuilles. Par contre, le BHA possède un meilleur pouvoir réducteur du Fer comparés aux différents extraits testés de *M. arvensis*.



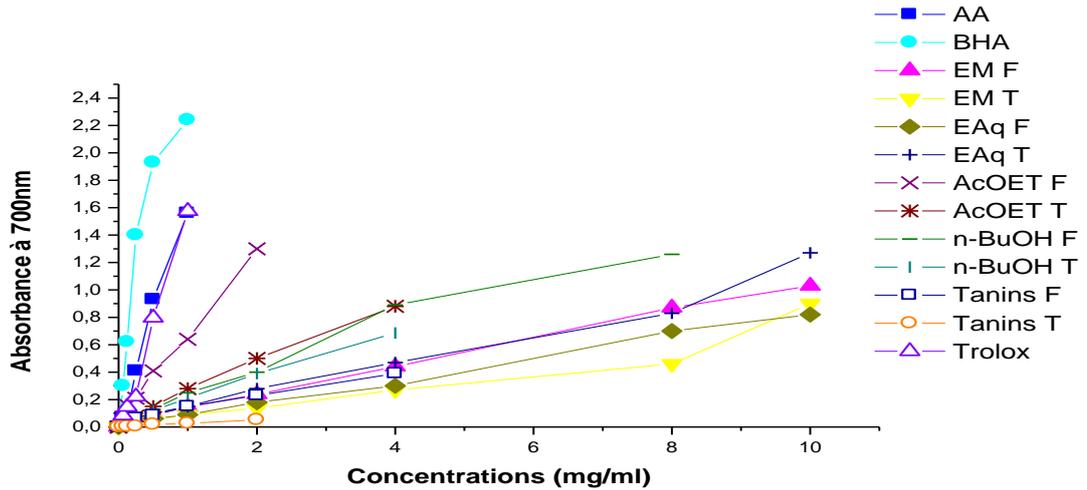
EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcO Et F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcO Et T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-but F : Fraction n-butanol feuilles ; n-but T: Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 49 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Moricandia arvensis*

d. Extraits d'*Atriplex canescens*

Les résultats obtenus dans la **figure 50**, démontrent la capacité de réduction de fer ; Les extraits bruts méthanolique et aqueux des feuilles et des tiges présentent une faible activité avec des valeurs observées de densités optiques (DO) qui ne dépassent pas le 1,2 (DO = 1,04 et DO = 0,90 pour les feuilles et les tiges, respectivement avec les extraits méthanolique). Mais avec les extraits aqueux, nous observons une augmentation de DO dans les tiges plus que dans les feuilles (DO = 0,83 et DO = 1,13 pour les feuilles et les

tiges, respectivement) à une concentration de 10,0 mg/ml. Les résultats obtenus dans la **figure 50**, montrent aussi que la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles représente l'activité la plus élevée pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 1,30 à la concentration 2,0 mg/ml par rapport à l'autre fraction des tiges qui a présenté une faible activité.

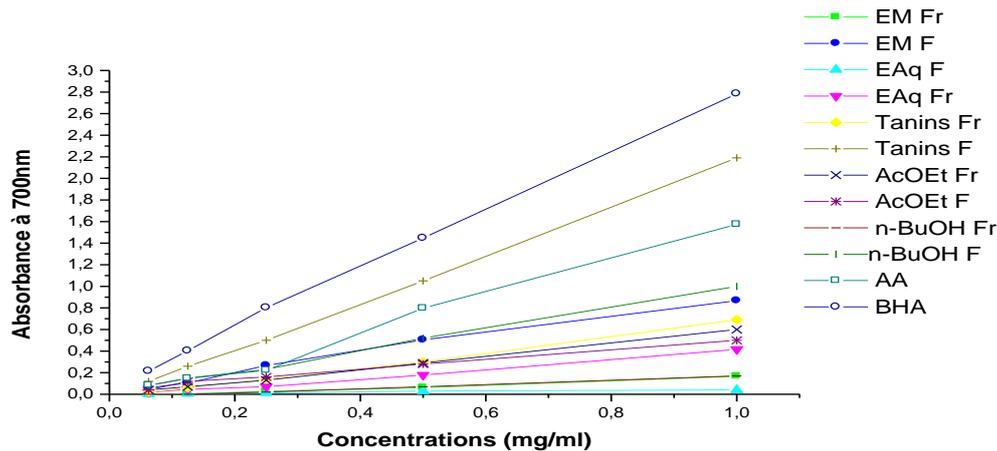


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol Feuilles ; n-BuOH T: Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 50 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Atriplex canescens*

e. Extraits de *Schinus molle*

Les résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait en tanins des feuilles de *Schinus molle* est largement supérieur par rapport aux autres extraits de la plante. A la concentration de 0,5 mg/ml, l'extrait en tanins possède une forte puissance de réduction de fer (DO=1,09), suivi de la fraction n-butanol feuilles (DO=0,53) et l'extrait méthanolique des feuilles (DO=0,51). L'extrait aqueux des deux parties présente une très faible capacité à réduire le fer (**Figure 51**).



EAQ F : Extrait aqueux feuilles ; EAQ Fr : Extrait aqueux fruits ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM Fr : Extrait méthanolique fruits ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt Fr : Fraction acétate d'éthyle fruits ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH Fr : Fraction n-butanol fruits ; F : Feuilles ; Frt : Fruits.

Figure 51 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des fruits de l'espèce *Schinus molle*

I.4. Test du blanchiment du β -carotène :

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. Tous les extraits des plantes inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libres.

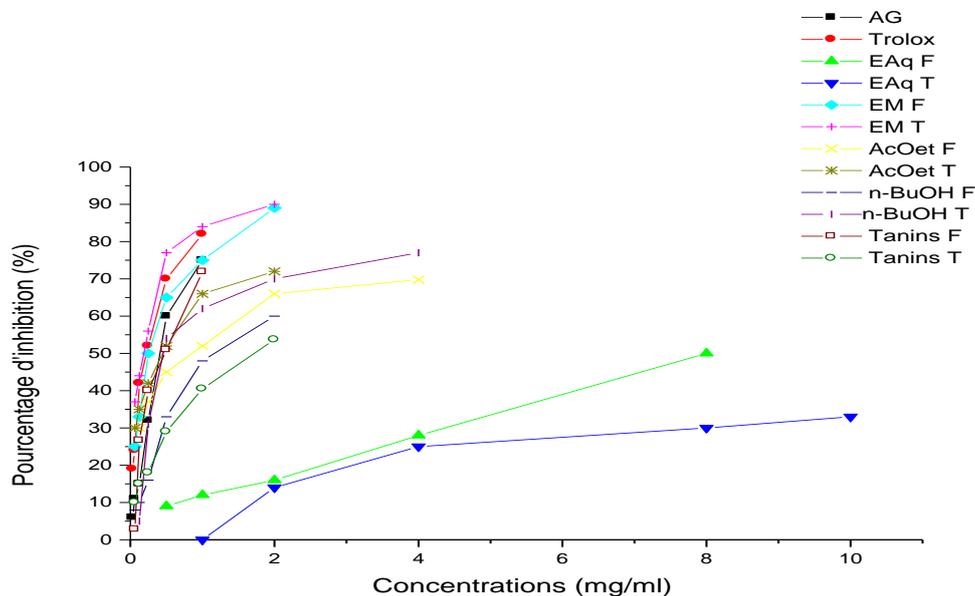
Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006**). Selon plusieurs auteurs, ce test paraît très utile comme modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

Etant donné que ce test est basé sur un système d'émulsion des lipides dans l'eau, **Frankel et Meyer en 2000** ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes que les antioxydants polaires. Dans ce système, les antioxydants apolaires sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et, par conséquent, l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont, donc, moins efficaces (**Frankel et Meyer, 2000**).

a. Extraits de *Nepeta nepetella*

La **figure 52** montre qu'à une concentration de 2,0 mg/ml, les différents extraits inhibent le blanchiment du β -carotène avec des pourcentages allant de 14,0 à 90,0%. L'ordre décroissant à cette même concentration des différents extraits de la plante est le suivant :

EM T (90,0%) > EM F (89,0%) > Tanins F (73,2%) > AcOEt T (72,0%) > n-BuOH T (70,0%) > AcOEt F (66,0%) > n- BuOH F (60,0%) > Tanins T (53,7%) > EAq F (16,0%) > EAq T (14,0%).



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

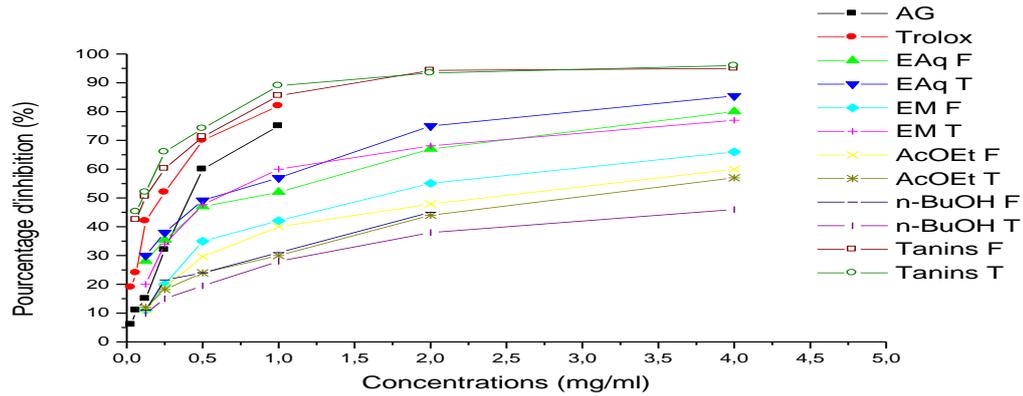
Figure 52 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Nepeta nepetella*

b. Extraits de *Mentha rotundifolia*

A une concentration de 0,5 mg/ml, nous remarquons que les extraits des tanins des deux parties de la plante présente une très bonne activité avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 74,11% pour les tiges et 71,2% pour les feuilles. Ces deux extraits possèdent une meilleure capacité d'inhiber le blanchiment du β -carotène que les standards utilisés (70,0% pour le Trolox et 60,0% pour l'acide gallique à cette même concentration) (**Figure 53**).

L'ordre décroissant des différents extraits de la plante est le suivant :

Tanins T (74,11%) > Tanins F (71,2%) > EAq T (49,2%) > EM T (47,66%) > EAq F (47,0%) > EM F (35,0%) > AcOEt F (29,6%) > AcOEt T (24,0%) > n- BuOH F (24,0%) > % > n- BuOH T (19,5%).

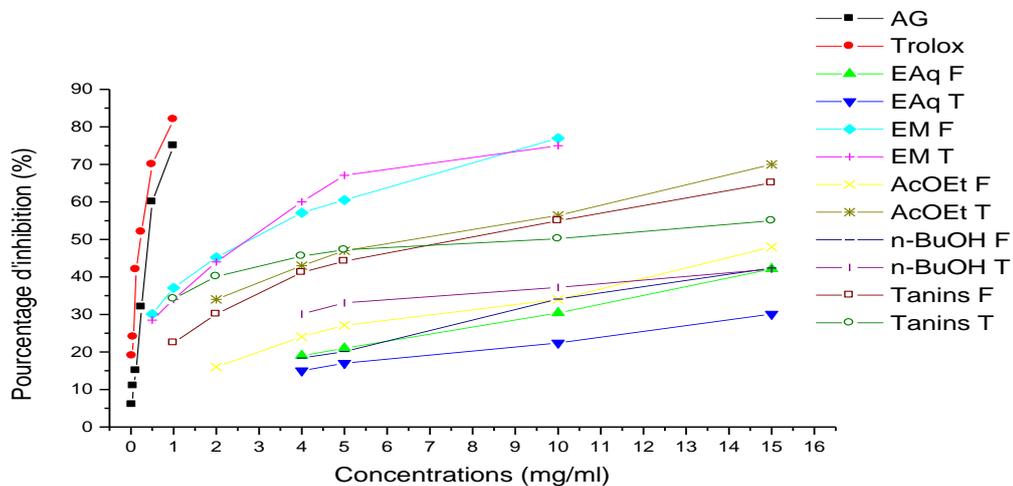


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 53 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Mentha rotundifolia*

c. Extraits de *Moricandia arvensis*

Les pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène des différents extraits des feuilles et des tiges de *M. arvensis* sont représentés dans la **figure 54**.



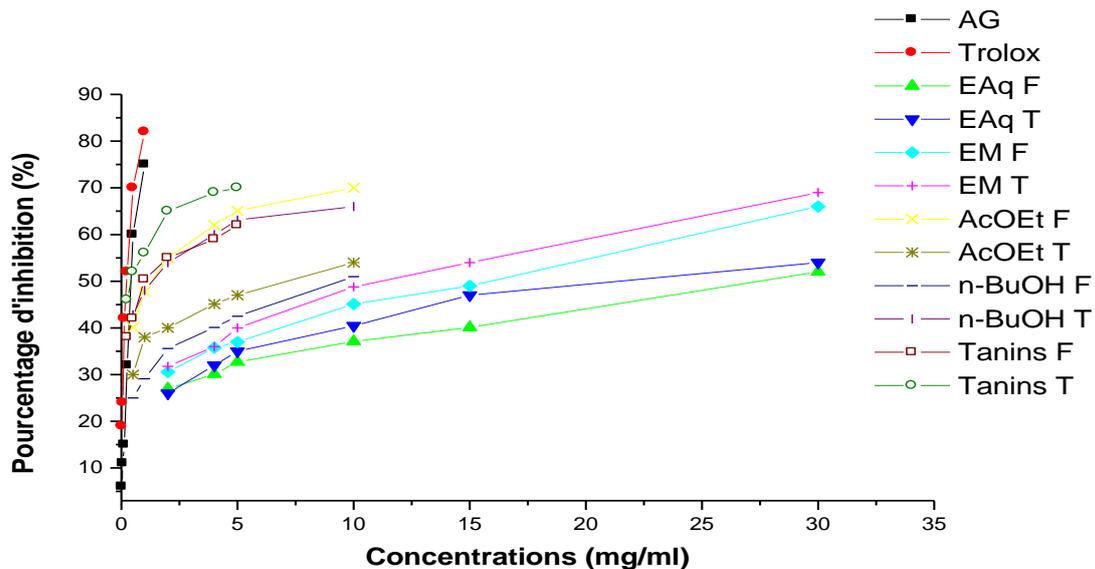
EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol Feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 54 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Moricandia arvensis*

En comparant les pourcentages d'inhibition à une concentration de 10,0 mg/ml des différents extraits de la plante étudiée, nous remarquons que l'extrait brut méthanolique des feuilles possède l'activité antioxydante la plus élevée 77,0% contre 22,4% seulement pour l'extrait brut aqueux des tiges à cette même concentration (10,0 mg/ml), cependant, ces différents extraits se révèlent avoir un faible potentiel antioxydant comparés aux standards utilisés.

d. Extraits d'*Atriplex canescens*

D'après la **figure 55**, nous remarquons qu'à la concentration 5,0 mg/ml ; les tanins des tiges et la fraction acétate d'éthyle des feuilles enregistrent le pourcentage d'inhibition le plus élevé (70,0% ; 65,1% respectivement) suivi par la fraction n-butanol des tiges (63,11%), tanins des feuilles (62,0 %), la fraction acétate d'éthyle des tiges (47,0%), la fraction n-butanol feuilles (42,5%) alors qu'à la même concentration, les autres extraits présentent des pourcentages faibles.

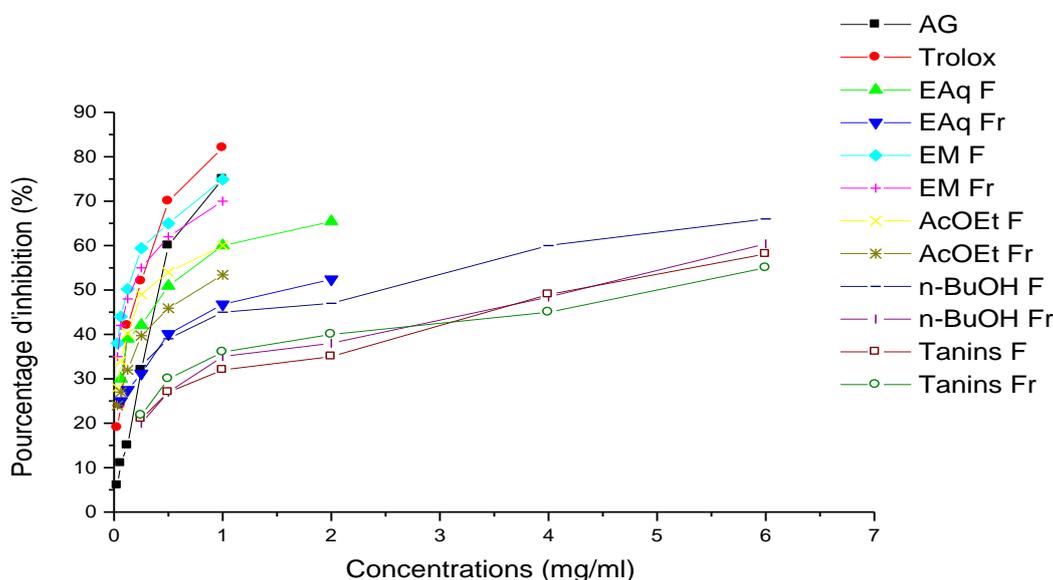


EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; F : Feuilles ; T : Tiges.

Figure 55 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Atriplex canescens*

e. Extraits de *Schinus molle*

La **figure 56** illustre les différents pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène à différentes concentrations.



EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq Fr : Extrait aqueux fruits ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM Fr : Extrait méthanolique fruits ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt Fr : Fraction acétate d'éthyle fruits ; n-BuOH F : Fraction n-butanol feuilles ; n-BuOH Fr : Fraction n-butanol fruits ; F : Feuilles ; Fr : Fruits.

Figure 56 : Test du blanchiment du β -carotène des extraits des feuilles et des tiges de l'espèce *Schinus molle*

Nous remarquons qu'à une concentration de 1,0 mg/ml, l'ordre décroissant des différents extraits de la plante est le suivant : EM F (74,89%) > EM Fr (70,0%) > EAq F (60,0%) = AcOEt F (60,0%) > AcOEt Fr (47,0%) > EAq Fr (46,5%) > n-BuOH F (45,0%) > Tanins Fr (36,0%) > n-BuOH Fr (35,0%) > Tanins F (32,0%).

Le calcul des valeurs des IC_{50} nous a permis d'évaluer l'efficacité de nos différents extraits (**Tableau 14**). Plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée.

L'analyse des résultats obtenus pour cette activité affiche une nette hétérogénéité de son efficacité en fonction de la nature de l'organe et du solvant utilisé. Considérant le premier paramètre, une tendance similaire à celle du pouvoir réducteur est décelée. En effet, les

feuilles et les tiges affichent des activités proches exprimées par des IC₅₀ comprises entre 0,10±0,12 et 29,31±0,02 mg/ml.

Par ailleurs, l'efficacité à inhiber le blanchiment du β-carotène varie d'une plante à une autre. Pour *N. nepetella*, nous remarquons que les extraits méthanolique des tiges et des feuilles ainsi que les fractions acétate d'éthyle et butanolique des tiges décèlent la meilleure activité antioxydante avec 0,148±0,00 mg/ml, 0,247±0,003 mg/ml, 0,35±0,04 mg/ml et 0,42±0,03 mg/ml respectivement, ces résultats sont très voisins des IC₅₀ des antioxydants de synthèses (Acide gallique 0,435±0,003 mg/ml et Trolox 0,242±0,003 mg/ml).

Les tanins des feuilles et des tiges de l'espèce *M. rotundifolia* s'avèrent très efficaces avec une meilleure activité que celle du contrôle utilisé, à savoir : Trolox (0,242±0,003 mg/ml).

Tableau 14. Valeurs des IC₅₀ du test du blanchiment du β-carotène des différents extraits des espèces végétales étudiées

Extraits des plantes		IC ₅₀ β-carotène (mg/ml)				
		EAc	EM	AcOEt	n-BuOH	Tanins
<i>Nepeta nepetella</i>	Feuilles	8,02±0,15	0,247 ± 0,003	0,92±0,03	1,2±0,02	0,52±0,1
	Tiges	24,815±0,26	0,148±0,00	0,35±0,04	0,42±0,03	1,9±0,02
<i>Mentha rotundifolia</i>	Feuilles	0,97±0,03	1,72 ±0,03	2,32±0,03	2,89±0,02	0,12±0,03
	Tiges	0,52±0,02	0,62±0,02	2,62±0,02	4,31±0,00	0,1±0,12
<i>Moricandia arvensis</i>	Feuilles	20,05±0,11	2,81±0,03	16,11±0,3	18,32±0,03	8,71±0,15
	Tiges	28,17±0,13	2,52±0,16	9,2±0,02	20,00±0,34	10,89±0,2
<i>Atriplex canescens</i>	Feuilles	29,31±0,02	16,26±0,02	1,5±0,02	9,11±0,08	0,95±0,02
	Tiges	17,2±0,03	11,13±0,8	8,47±0,03	8,77±0,15	0,32±0,1
<i>Schinus molle</i>	Feuilles	0,55±0,04	0,12±0,01	0,42±0,04	2,4±0,07	4,2±0,15
	Fruits	1,48±0,1	0,17±0,02	0,83±0,04	4,442±0,12	5,08±0,02
Acide gallique		0,435±0,003				
Trolox		0,242±0,003				

Pour les extraits de *M. arvensis*, on remarque qu'ils ont une capacité antioxydante modérée, voir faible pour inhiber l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène

avec des IC_{50} allant de $2,52 \pm 0,16$ mg/ml pour l'extrait méthanolique des tiges à $28,17 \pm 0,13$ mg/ml pour l'extrait aqueux des tiges.

L'extrait des tanins des tiges d'*A. canescens* a montré une bonne capacité à inhiber le blanchiment du β -carotène avec IC_{50} de l'ordre de $0,32 \pm 0,10$ mg/ml suivi de l'extrait des tanins des feuilles $0,95 \pm 0,02$ mg/ml, le reste des extraits a une activité modérée à inhiber le blanchiment du β -carotène.

Les extraits méthanoliques de *S. molle* se révèlent très efficaces avec des IC_{50} de l'ordre de $0,12 \pm 0,01$ mg/ml pour les feuilles et $0,17 \pm 0,02$ mg/ml pour les tiges, suivi de la fraction acétate d'éthyle des feuilles $0,42 \pm 0,04$ mg/ml.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des espèces choisies.

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (**Prior et al., 2005**). Pour cette raison, nous avons combiné quatre techniques complémentaires : la CAT, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le test du blanchiment du β -carotène.

La faible activité antioxydante des extraits bruts aqueux et méthanolique des différentes plantes étudiées malgré les fortes teneurs en polyphénols corrobore les travaux de **Sun et al., 2005** ainsi que ceux de **Moure et al., 2001**, qui ont démontré qu'une activité antioxydante n'est pas due nécessairement à la forte teneur en polyphénols.

Cependant après fractionnement des composés phénoliques : fraction acétate d'éthyle, fraction butanolique et extrait des tanins, nos différentes espèces végétales se sont avérées avoir un bon potentiel antioxydant. Dans la majorité des cas, le solvant acétate d'éthyle concentre bien le principe actif. La bonne activité des fractions est due à leur richesse en composés phénoliques contrairement aux extraits bruts doués d'une faible activité antioxydante. Au delà de ses objectifs, cette étude permettra de révéler de nouvelles molécules antioxydantes, ce qui donne l'espoir qu'une purification plus poussée placera ces principes actifs à la hauteur des spécialités pharmaceutiques.

I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles

Dans notre étude, l'activité antioxydante des huiles essentielles des différentes parties de *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* et *Schinus molle* est évaluée par deux méthodes ; le test de la réduction du radical libre DPPH et le test de blanchiment du β -carotène. Les résultats ont été repris dans le **tableau 15**.

Tableau 15. Valeurs des IC₅₀ des différentes huiles essentielles étudiées

Huile essentielle	IC ₅₀ DPPH (mg/ml)	IC ₅₀ β-carotène (mg/ml)
HE NN PA	0,86±0,00	3,85±0,67
HE NN F	1,50± 0,07	10,02±0,01
HE NN Fl	1,27±0,02	5,77±0,16
HE MR F	0,30±0,14	0,82±0,07
HE MR T	0,8 ±0,14	1,70±0,21
HE SM F	60,20±0,10	3,57±0,04
HE SM Fr	30,00 ±0,70	4,54±0,32
Trolox	-	0,242±0,003
AA	0,12±0,08	-

HE: huile essentielle; NN: *Nepeta nepetella* ; MR : *Mentha rotundifolia* ; SM : *Schinus molle*; PA: parties aériennes ; F : feuilles ; Fl : fleurs ; Fr : Fruits ; AA : Acide ascorbique.

A la lumière de la lecture des résultats mentionnés dans le **tableau 15**, on en déduit que l'activité antioxydante des huiles essentielles des deux espèces de lamiacées est la plus intéressante. L'ordre de la tendance des huiles essentielles à réduire les radicaux libres du DPPH est le suivant : *M. rotundifolia* F (IC₅₀= 0,30 mg/ml) > *M. rotundifolia* T (IC₅₀= 0,80 mg/ml) > *N. nepetella* PA (IC₅₀= 0,86 mg/ml) > *N. nepetella* Fl (IC₅₀= 1,27 mg/ml) > *N. nepetella* F (IC₅₀= 1,50 mg/ml) > *S. molle* Fr (IC₅₀= 30,00 mg/ml) > *S. molle* F (IC₅₀= 60,20 mg/ml).

Pour les huiles essentielles de *M. rotundifolia*, nos résultats corroborent avec ceux de **Nickavar et al., 2008** qui ont travaillé sur la même espèce de provenance de l'Iran, IC₅₀ est de l'ordre 0,217 mg/ml. D'autres espèces du même genre sont reconnues aussi pour le fort pouvoir antioxydant : *M. pulegium* (IC₅₀= 0,57 µg/ml, **Souri et al., 2004**), *M. piperita* (IC₅₀= 13,32 µg/ml), *M. longifolia* (IC₅₀= 24,07 µg/ml) et *M. spicata* (IC₅₀= 1,14 µg/ml) (**Souri et al., 2008**). Cette forte activité à réduire les radicaux libres est due en grande majorité à la composition chimique de l'huile essentielle.

Pour les huiles de *Nepeta nepetella*, aucun travail n'a été réalisé sur son activité antioxydante.

Cependant, nos résultats s'avèrent plus élevés que ceux de **Adiguzel et al., 2009** qui ont travaillé sur l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Nepeta catarina* qui s'est montrée inactive.

L'ensemble des résultats de *Schinus molle* nous amènent à déduire que les huiles essentielles ne possèdent aucune activité anti-radicalaire ; aussi certains auteurs avancent que les huiles essentielles de cette espèce ont un très faible pouvoir antioxydant (**Díaz et al., 2008 ; Murray et al., 2009 ; Bendaoud et al., 2010 ; Zahed et al., 2010 ; Salazar-Aranda et al., 2011**).

En ce qui concerne la capacité des différentes huiles essentielles étudiées à inhiber le blanchiment du β -carotène (**Tableau 15**), l'espèce *Mentha rotundifolia* s'est montrée la plus active $IC_{50}=0,82\pm 0,07$ mg/ml pour les feuilles et $IC_{50}=1,70\pm 0,21$ mg/ml pour les tiges.

L'activité des huiles de deux espèces, à savoir : *N. nepetella* et *S. molle* reste modérée en comparaison avec le contrôle positif utilisé (Trolox) dont IC_{50} est égale à $0,242\pm 0,003$ mg/ml.

Cependant, il est prouvé que les activités antioxydantes des composés majoritaires des huiles essentielles testées séparément, donnent, souvent, des résultats inférieurs comparés à l'activité totale de l'huile essentielle (**Safaei-Ghomi, 2009**). En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle est à l'origine du pouvoir antioxydant. En outre, certains constituants des huiles essentielles tels que les constituants hydrocarbonés possèdent aussi une forte activité antioxydante (**Vardar-Ünlü, 2003**).

II. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes

II.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

L'activité antimicrobienne des extraits obtenus à partir des différentes plantes étudiées a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme dans une même boîte de Pétri (**Rios et Recio, 2005**). Les résultats obtenus sont mentionnées dans le **tableau 16**.

Tableau16. Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits des cinq espèces végétales étudiées relatives aux souches testées selon la méthode des disques

Plantes étudiées	Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)								
		Bactéries Gram +		Bactéries Gram -			Moisissures		Levures	
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans IP</i>
<i>Nepeta nepetella</i>	EAq F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EA T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM F	7,00	8,00	9,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM T	6,00	6,00	8,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	11,00	8,00
	AcOEt T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,00
	Tanins T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	7,00	6,00
	HE PA	6,00	14,00	6,00	6,00	10,00	26,00	16,00	14,00	16,00
	HE F	6,00	12,00	12,00	8,00	9,00	17,00	15,00	18,00	18,00
	HE Fl	6,00	12,00	12,50	8,00	10,00	21,00	13,50	17,25	8,00

<i>Mentha rotundifolia</i>	EAq F	6,50	6,00	9,90	6,10	6,00	6,00	6,00	8,20	6,30
	EAq T	6,30	6,11	6,12	6,00	6,12	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM F	9,50	7,00	10,40	9,00	6,00	6,00	6,00	10,00	7,50
	EM T	6,00	6,00	7,50	6,50	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,00
	AcOEt T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	11,00	8,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	12,00	8,00
	Tanins T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	11,50	9,00
	HE PA	18,66	16,00	17,66	8,66	13,33	30,00	32,00	28,33	26,66
HE F	15,33	18,00	11,00	6,00	7,66	27,00	24,50	31,33	25,33	
<i>Moricandia arvensis</i>	EAq F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EA T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM F	6,00	7,00	6,00	9,00	6,00	6,00	6,00	8,00	6,00
	EM T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,00

	AcOEt T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,50
	Tanins T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	9,00	7,00
<i>Atriplex canescens</i>	EAq F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EA T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM F	6,00	7,00	6,00	9,00	6,00	6,00	6,00	9,00	6,50
	EM T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt F	6,00	6,00	6,30	6,00	6,00	6,00	6,00	10,50	7,00
	AcOEt T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	10,00	8,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins F	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	11,50	8,00
	Tanins T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Schinus molle</i>	EAq F	6,00	6,00	9,90	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EA Fr	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	EM F	7,00	7,00	11,00	9,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00

	EM Fr	6,00	6,00	9,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AcOEt Fr	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH F	6,00	6,00	9,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	n-BuOH Fr	6,00	6,00	8,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins F	6,00	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Tanins T	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	HE F	10,00	7,20	14,50	11,00	8,00	32,00	32,00	26,00	21,50
	HE Fr	12,00	9,50	12,00	6,00	6,00	29,00	29,00	18,00	15,00
	DMSO (10 µl/disque)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	AMX (25 µg/disc)	26,00	25,00	12,00	6,00	6,00	-	-	-	-
	VA (30 µg/disc)	16,00	15,00	8,00	6,00	6,00	-	-	-	-
	CN (30 µg/disc)	28,00	6,00	18,00	6,00	10,00	-	-	-	-
	AMP (10 µg/disque)	27,00	6,00	15,00	6,00	6,00				
	OX (1 µg/disque)	16,00	6,00	6,00	6,00	6,00	-	-	-	-
	OF (5 µg/disque)	27,00	25,00	29,00	24,00	20,00	-	-	-	-
	CIP (5 µg/disque)	25,00	29,00	28,00	28,00	24,00	-	-	-	-
	Ny (30 µg/disque)	-	-	-	-	-	22,00	34,00	19,00	20,00

EAq F : Extrait aqueux feuilles ; EAq T : Extrait aqueux tiges ; EM F : Extrait méthanolique feuilles, EM T : Extrait méthanolique tiges ; AcOEt F : Fraction acétate d'éthyle feuilles ; AcOEt T : Fraction acétate d'éthyle Tiges ; n-BuOH F : Fraction n-butanol Feuilles ; n-BuOH T : Fraction n-butanol tiges ; HE : Huile essentielle ; F : Feuilles ; T : Tiges ; Fl : Fleurs ; Fr : Fruits ; DMSO : Diméthylsulfoxyde (contrôle négatif) ; Contrôles positifs : Céphalexine CN. 30µg/disc), AMX. Amoxicilline ; VA. Vancomycine ; AMP. Ampicilline ; OX. Oxacilline ; OF. Ofloxacin ; CIP . Ciprofloxacine ; Ny. Nystatine.

L'aromatogramme est une méthode qualitative, simple, appliquée en routine à tout microorganisme considéré comme pathogène. Cette méthode permet d'explorer un grand nombre d'extraits vis-à-vis de chaque souche (Cos et al., 2006).

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des différents extraits, des espèces sélectionnées, dissouts dans le DMSO vis-à-vis des différentes souches microbiennes, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un microorganisme à un autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits s'explique par les variations de leurs compositions chimiques.

Il a été rapporté, qu'un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure à 10 mm (Tekwu et al., 2012).

Au vu des résultats obtenus, nous remarquons que la majorité des extraits testés n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées et ceci à une concentration de 30 mg/ml soit, 300 µg/disque. La nature du solvant, la méthode d'extraction ainsi que la quantité des extraits mise dans les disques pourrait être à l'origine de ces résultats.

Par ailleurs, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Nepeta nepetella* possède une activité modérée contre *Candida albicans* (11 mm). Aussi, cette levure s'est montrée sensible aux extraits des tanins des feuilles et des tiges et à l'extrait de l'acétate d'éthyle des tiges de *Mentha rotundifolia* avec des zones d'inhibition variant entre 11 et 12 mm. L'extrait méthanolique des feuilles de *Mentha rotundifolia* est également actif vis-à-vis de *Candida albicans* et d'*Escherichia coli* avec des diamètres de l'ordre de 10 et 10,4 mm, respectivement. Par ailleurs, la fraction acétate d'éthyle des feuilles et des tiges ainsi que l'extrait des tanins des feuilles d'*Atriplex canescens* présentent également une sensibilité contre *Candida albicans*. En outre, une activité modérée a été observée avec *Escherichia coli* (11 mm) vis-à-vis de l'extrait méthanolique des feuilles de *Schinus molle*.

Suite à une étude réalisée sur le pouvoir antimicrobien de différents extraits bruts aqueux, butanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et hexanique de deux espèces *Nepeta leavigata* et de *Nepeta kurramensis* vis-à-vis de plusieurs souches dont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. Seule la fraction butanolique de *Nepeta leavigata* qui était active contre *Escherichia coli* (20 mm). Par contre, *Klebsiella pneumoniae* s'est montrée résistante aux différentes fractions des deux espèces végétales. Les autres fractions chloroformique et acétate d'éthyle des deux plantes se

sont révélées actives vis-à-vis de *Candida albicans*, mais avec des CMI élevées variant entre 2 et 4 mg/ml. Par contre, les moisissures étaient sensibles à la majorité des fractions de *Nepeta leavigata*, avec des CMI faibles entre 2 et 3 mg/ml (**Khan Shinwari et al., 2013**).

Concernant les huiles essentielles, il a été rapporté dans la littérature, qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm (**Rossi, 2003**).

Cependant, les huiles essentielles des différentes parties de *Nepeta nepetella*, de *Mentha rotundifolia* et de *Schinus molle* montrent une sensibilité aux différentes souches testées et en particulier vis-à-vis des levures et des moisissures. Ainsi, les huiles essentielles des parties aériennes, des feuilles et des fleurs de *Nepeta nepetella* présentent une activité modérée contre *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition variant entre 12 et 14 mm. Par contre, les moisissures et les levures se sont révélées très sensibles à ces huiles essentielles, particulièrement *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* vis-à-vis des huiles essentielles des fleurs, avec des diamètres de l'ordre de 17,25 et 21 mm, respectivement. Ceci est probablement dû à sa richesse en nepetalactone $4\alpha,7\alpha,7\beta$ avec un pourcentage de 82,3 contre 64,3% et 67,9% au niveau des parties aériennes et des feuilles, respectivement. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Ezzatzadeh et al. (2014)** qui ont évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles et des parties aériennes de *Nepeta asterotricha* en pleine floraison, par la méthode des disques sur plusieurs souches microbiennes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, avec des zones d'inhibition variant entre 12 et 24 mm. Ils ont rapporté également que, les huiles essentielles des feuilles étaient plus actives que celles des parties aériennes. Ceci est dû aussi à leur richesse en isomères nepetalactone, de l'ordre de 18,9% contre 10,7%, respectivement. Aussi **Srifi et al., 2013** ont montré que l'activité antifongique (levures et moisissures) serait due au constituant $4\alpha,7\alpha,7\beta$ -nepetalactone et qu'il serait utile de le tester à l'état pur pour confirmer ces résultats.

De même, les moisissures et les levures se sont révélées également très sensibles aux huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles de *Mentha rotundifolia*, avec des zones d'inhibition variant entre 24,5 et 32 mm. Aussi, ces huiles essentielles ont agi de façon active sur la majorité des bactéries testées, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, avec des diamètres variant entre 15,33 et 18,66 mm. **Riahi et al. en 2013** ont déterminé le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* (contenant de la pulégone à 32,1% suivi par l'oxyde de pipériténone 17,3%), sur

plusieurs souches microbiennes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Ils ont noté une forte activité antibactérienne sur l'ensemble des bactéries testées avec des diamètres variant entre 23 et 34 mm. Par contre, les champignons se sont montrés moins sensibles (21-23 mm). Aussi, **Ladjet et al.** en **2011** ont démontré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* est importante contre *Escherichia coli* (24 mm). Une autre étude réalisée par **Derwich et al.**, en **2010**, montre que l'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Mentha rotundifolia* était très importante vis-à-vis de toutes souches testées et particulièrement contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de l'ordre de 45 et 34 mm, respectivement. Ils signalent également la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, avec des zones d'inhibition de l'ordre de 17 et 19 mm, respectivement.

Par ailleurs, nous avons constaté une activité modérée des huiles essentielles des feuilles de *Schinus molle* contre *Escherichia coli*, avec une zone d'inhibition de l'ordre de 14,5 mm. Inversement, les huiles essentielles des feuilles et des fruits de cette même espèce végétale sont très actives vis-à-vis des deux levures testées (diamètres : 15-26 mm). De même, les moisissures *Aspergillus flavus* et *A. fumigatus* se sont montrées très sensibles à ces huiles essentielles avec des zones d'inhibition de l'ordre de 29 et 32 mm, respectivement.

Il a été rapporté que les huiles essentielles des plantes, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (**Rios et Recio, 2005**). Elles ont l'avantage de ne pas engendrer une résistance bactérienne du à leur contenu en un large spectre de composés bioactifs (**Maggi et al., 2009**). Selon Candan et ses collaborateurs (**2003**), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Ceci est du probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'intercaler dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

Nous avons constaté que la souche *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante aux huiles essentielles. Ceci peut être lié à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières. La pathogénicité de cette bactérie est due à la production de plusieurs facteurs de virulence intra et extracellulaires (**Rumbaugh et al., 1999**).

II.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne d'un produit en milieu liquide est une méthode incontournable, si on veut déterminer secondairement la concentration minimale bactéricide (CMB) (Chevalier, 2003). Pour cela, nous avons déterminé le pouvoir antimicrobien de ces trois huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu liquide contre les souches microbiennes les plus sensibles. Les résultats obtenus sont reportés dans le **tableau 17**.

Tableau 17. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles actives

Plantes étudiées	Parties étudiées	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i> IP 444		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>	
		CMI (µl/ml)	CMF (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)
<i>N. nepetella</i>	HE PA	>10	>10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
	HE F	>10	>10	>10	>10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
	HE Fl	10	10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
<i>M. rotundifolia</i>	HE PA	5	10	5	10	1,25	1,25	2,5	5	5	10
	HE F	5	>10	10	10	10	>10	5	5	Nt	Nt
<i>S. molle</i>	HE F	2,5	5	5	10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
	HE Fr	10	10	5	5	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt

HE : Huile essentielle ; PA : Parties aériennes ; F : Feuilles ; Fl : Fleurs ; Fr : Fruits ; Nt : Non testé.

D'après les résultats obtenus dans le **tableau 17**, nous avons remarqué que cette méthode confirme les résultats obtenus avec la méthode de diffusion sur disque. Nous avons constaté également que les huiles essentielles des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* sont les plus actives contre toutes les bactéries testées avec des CMI variant entre 1,25 et 5 µl/ml. Cependant, la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* s'est révélée la plus sensible avec une CMI et une CMB très faible de l'ordre de 1,25 µl/ml. Cette bonne activité est due à leurs compositions chimiques dont les composés majoritaires sont : menthone, pulégone et isomenthone qui représentent à eux seuls 50,2% dans les feuilles et 46,0% dans les parties aériennes. En effet, **Flamini et al. (1999)** ont testé l'activité de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* et de ses constituants majoritaires (limonène, menthone, pulégone, menthol) vis-à-vis de plusieurs bactéries et moisissures. Ils rapportent que seule la pulégone a une activité antimicrobienne. Ceci a déjà été confirmé par **Sivropoulou et al., en 1995**, et rapporté récemment par **Salehi et al., en 2005**. Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Derwich et al. en 2010** qui avancent une activité antibactérienne très

efficace des huiles essentielles des feuilles de *Mentha rotundifolia* contenant 40,5% de menthol, avec des CMI très faibles variant entre 25 et 61 mg/100 ml contre les souches suivantes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons noté aussi que les huiles essentielles des feuilles de *Schinus molle* est efficace contre *Candida albicans* qui s'est montrée sensible, avec une CMI de l'ordre de 2,5 µl/ml. Il est à noter que **Hayouni et al.** en **2008** rapporte que *Candida albicans* s'est avérée moins sensible aux huiles essentielles des fruits de *Schinus molle* (dont les composés majoritaires sont : α-phellandrène (35,9%) et β-phellandrène (29,3%)) avec une CMI de 36 mg/ml.

Par ailleurs, nous avons enregistré des CMI très importantes supérieures ou égales à 10 µl/ml avec les huiles essentielles des différents organes de *Nepeta nepetella* contre les levures. Une étude a été réalisée sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes de *Nepeta sibirica* très riche en 4α,7α,7α-nepetalactone (**Tsuruokaa et al., 2012**). Ces auteurs rapportent des CMI faibles variant entre 1024 et 2048 µg/ml contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. De même, **Gormez et al.**, en **2013**, avancent une activité antibactérienne très significative des huiles essentielles des parties aériennes en pleine floraison de *Nepeta nuda*, avec des CMI très faibles variant entre 7,81 et 31,24 µg/ml contre plusieurs souches de *Pseudomonas*, d'*Erwinia*, de *Bacillus* et d'*Enterobacter*. Il est à noter que les composés majoritaires de ces huiles essentielles sont : 4α,7β,7α-nepetalactone (18,1%), germacrène (15,7%) et élémol (14,4%).

L'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique. On considère que les huiles essentielles riches en composés oxygénés sont celles qui donnent les meilleurs activités et à l'inverse celles qui sont riches en constituants hydrocarbonés ont une activité modérée (**Burt, 2004**).

De nombreux travaux ont démontré la corrélation entre l'activité antibactérienne et le profil chimique d'une huile essentielle. Ces travaux classent l'activité exercée par les composés majoritaires des huiles essentielles dans l'ordre suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures (**Kalemba et Kunicha, 2003**).

Conclusion générale

Le présent travail avait pour but l'isolement des métabolites secondaires, leurs extractions, leurs quantifications, ainsi que la détermination de leur activité antioxydante et antimicrobiennes.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence différentes familles de composés chimiques dans les différentes parties des espèces végétales étudiées, *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*, appartenant respectivement aux familles des lamiacées, brassicacées, amaranthacées et anacardiées. Ces espèces sont utilisées par les thérapeutes traditionnels pour leurs différentes propriétés.

Pour valoriser ces espèces, plusieurs extraits de métabolites secondaires, des différentes parties ont été évalués par des méthodes chimiques. Les tests phytochimiques menés sur ces cinq espèces ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires phénoliques susceptibles d'avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes. L'épuisement des parties par des solvants de polarité différente a révélé la présence : des flavonoïdes, des tanins pour les cinq espèces et présence des huiles volatiles dans *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis* et *Schinus molle*.

Ces espèces végétales ont présenté des rendements variables en extraits bruts secs. Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux des feuilles de *M. arvensis* (30,89%), tandis que le rendement des extraits méthanoliques varie de 3,90 à 23,40%.

La teneur des phénols totaux, et des flavonoïdes est variable entre les différentes parties des cinq espèces étudiées.

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu ; cette analyse a montré que les extraits bruts issus des différentes parties des espèces végétales ont une teneur élevée dans l'extrait aqueux que l'extrait méthanolique.

L'extraction des huiles essentielles des différentes parties de *N. nepetella*, *M. rotundifolia* et *S. molle* a montré des rendements allant de 0,3 à 1,5%.

Les résultats de l'analyse chimique de ces huiles essentielles varient quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée. L'étude des huiles essentielles de *N. nepetella* a permis d'identifier 21 composés représentant 91,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, 17 pour les fleurs (92,9%) et 22 composés pour les parties aériennes (88,3%), celle de *M. rotundifolia* a permis d'identifier 42 composés pour les

parties aériennes ainsi que pour les feuilles, représentant 91,8% et 93,9% respectivement, et celle de *S. molle* a permis d'identifier 35 composés représentant 89,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, et 39 pour les fruits (68,6%).

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'ensemble des extraits des différentes parties des plantes par quatre méthodes : Capacité antioxydante totale (CAT), méthode piégeage de radical libre (DPPH), capacité à réduire le fer (FRAP) et technique du blanchiment du β -carotène. Ces méthodes ont montré que tous les extraits des cinq espèces végétales ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux pour piéger les radicaux, à réduire le fer, et à protéger l'oxydation du β -carotène. Les extraits des tanins des feuilles et des tiges de *M. rotundifolia* présentent une importante activité antioxydante en comparaison avec les autres espèces. La meilleure activité de piégeage du radical libre DPPH \cdot est obtenue avec des valeurs de IC₅₀ 0,12 mg/ml pour les feuilles et 0,08 mg/ml pour les tiges, qui sont comparables aux antioxydants de synthèse acide ascorbique et BHA. Par ailleurs, ces extraits de *M. rotundifolia*, ceux méthanoliques des feuilles et des tiges de *N. nepetella*, ceux de *S. molle* et celui des tanins des tiges d'*A. canescens* ont montré une bonne capacité à inhiber le blanchiment du β -carotène. Concernant les autres extraits, *M. rotundifolia* et *S. molle* sont moins importants mais intéressants comparativement aux extraits de *M. arvensis* et *A. canescens* qui ont des activités plus faibles.

L'étude de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) a montré que majorité des extraits testés ont une activité relativement faible vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées. Cependant, Les huiles essentielles des différentes parties de *N. nepetella*, de *M. rotundifolia* et de *S. molle* montrent une sensibilité aux différentes souches testées et en particulier vis-à-vis des levures et moisissures. De même, les huiles essentielles des parties aériennes de *M. rotundifolia* se sont avérées les plus actives contre *Candida albicans* et certaines bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*).

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes des plantes choisies et de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêt biologique afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives sont envisagées :

✓ Compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules isolées en utilisant des techniques chromatographiques, spectrales et spectrophotométriques.

✓ Elargir le panel des tests des activités *in vitro*, évaluer et tester les différents extraits et molécules isolées *in vivo* afin d'y trouver une application pharmaceutique de ces molécules actives, ou alors en conservation des produits destinés à la consommation.

Références bibliographiques

Abdel-Sattar E., Zaitoun A.A., Farag M. A., El Gayed S.H., Harraz F.M.H. ; (2010).
Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*.
Natural Product Research,
24(3) : 226-235.

Adams R. P. ; (1989).
Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. *Academic Press, Inc.*, San Diego. California.

Adams R.P. ; (2007).
Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL.

Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., Inan K., Gulluce M., Sahin F. ;(2009).
Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey.
J. Microbiology Method ,**79** : 321-328.

Alami M., Barret R., Brion J. D., Enguehard-Gueiffier C., Foliot P., Gaudy C., Gerondeau N., Gueiffier A., Lanotte P., Leconte-Astruc V., Mereghetti L., Peyrat J. F., Ratsimbazafy V., Tandé D. ; (2005).
In *Pharmacothérapie Pratique à L'officine : L'essentiel, Antibiotiques: Pharmacologie et Thérapeutique. Elsevier*, P14.

Allain P. ; (1996).
Les Médicaments. Ed ESTEM, Paris.

Amarowicz R., Pegg R., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J. ; (2004).
Free-radical scavenging capacity antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.
Food Chem., **84** : 551-562.

Arnold A., Bellomaria B., Valentini G., Yanniou C., and ArnoldH.J. ; (1993b).
Etude Anatomique et Phytochimique de *Nepeta troodi* Holmboe (Labiées) endémique de Chypre.
Plant. Med. Phytother., **Tome XXVI**, n.1: 52-63.

Arnold A., Valentini G., Bellomaria B., Arnold H. J. ; (1993a).
Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle de *Nepeta parnassica* Heldr. & Sart. ex Boiss.
Plant. Med. Phytother., **Tome XXVI**, N. 2 : 149-157.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J. Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. ; (1995).
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris. France.

Atik Bekkara F., Bousmaha L., Bendiab S. A. T., Boti J. B., J. Casanova. ; (2007).
Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen.
Biologie et Santé, **7** : 6–11.

Augusto F., Leite E Lopes A., Zini C. A. ; (2003).
Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances.
Trends Anal. Chem., **22(3)** : 160-169.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. ; (1996).
Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations.
Arznei. Forschung., **46**: 1086-1089.

- Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J. ; (2001).**
Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha Nepeta* from Corsica (France).
Flavour and Fragrance J., **15** : 50- 54.
- Bandh S.A., Kamili A.N., Ganai B.A., Lone B.A., Saleem S. ; (2011).**
Evaluation of antimicrobial activity of aqueous extracts of *Nepeta cataria*.
J. Pharm. Res., **4(9)** : 3141-3142.
- Barrachina M.D., Bello R., Martínez-Cuesta M.A., Primo-Y.fera E., Esplugues J. ; (1997).**
Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L.
Phytother. Res., **11** : 317–319.
- Bardeau F. ; (1976).**
La médecine par les fleurs. Ed. Robert Laffont. Paris-France.
- Bardeau F. ; (1986).**
Le pharmacien du bon Dieu. Ed. Stoch. Paris-France.
- Baser K.H.C., Kurkcuoglu M., Demircakmak B., Ulker Nasuh, Beis Sedat H. ; (1997).**
Composition of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Turkey.
Journal of Essential Oil Research, **9(6)** : 693-696.
- Baser K.H.C., Özek T. ; (1994).**
Composition of the asterotri-essential oil of *Nepeta caesarea* Boiss. from Turkey.
J. Essent. Oil Res., **6** : 645-646.
- Baser K.H.C., Özek T., Akgül A., Tümen G. ; (1993).**
Composition of the essential oils Of *Nepeta Racemosa* Lam.
J. Essent. Oil Res, **5** : 215-217.
- Bathily D. ; (2002).**
Etude de deux plantes a activité antioxydante au Mali : *Lannea Velutina* A. Rich. (Anacardiaceae),
Psorospermum Guineense Hochr (Hypericaceae).
Thèse de Pharmacie, FMPOS, Bamako.
- Becker M., Picard J.F., Timbal H. ; (1982).**
Larousse des arbres, des arbustes et des arbissaux. Librairie Larousse.
- Bekhechi C., Atik Bekkara F., Consiglio D., Bighelli A., Tomi F. ; (2012).**
Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algéria.
Chemistry and Biodiversity, **9** : 2743-2753.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R., Rome S. ; (1998).**
Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia Faba* diffeting in
their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation.
J. Plant and Soil, **203** : 27-36.
- Belhamel K., Abderrahim A., Ludwig R. ; (2008).**
Chemical composition and antibacterial of essential *Schinus molle* L. grown in Algeria.
International Journal of Essential Oil Therapeutics, **2** : 175-177.
- Bello R., Barrachina M.D., Moreno L., Primo-Y. Fera E., Espluges J. ; (1996).**
Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus Molle* L. in rats.
Phytother. Res., **10** : 05-634.

- Bello R., Beltrán B., Moreno L., Calatayud S., Primo-Yúfera E., Espluges J. ; (1998).**
In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L.
Phytother. Res., **12** : 523-525.
- Belmekki N., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X. ; (2013).**
Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium Polium* L. essential oil from Western Algeria.
Journal of Medicinal Plants Research, **7(14)**: 897-902.
- Belot A. ; (1978).**
Dictionnaire des arbres et arbustes de jardins.
Ed. Bordas, Paris.
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., Aouni M. ; (2008).**
Antiviral activity of some tunisian medicinal plants against herpes simplex virus type 1.
Natural Product Research, **22** : 53–65.
- Benabadji N., Ghezlaoui B-E., Bouazza M., Bendimerad N. ; (2010).**
Phytoécologie et composés secondaires d'un peuplement végétal steppique : cas de *Pseudocytisus Integrifolius* (Salisb.) Rehder dans le Chott El-Gharbi (Oranie-Algérie).
Mediterranea Serie De Estudios Biológicos Época II N° 21, appears in collections : REV-MED - N° 21.
- Bendaoud H., Romdhane M., Souchard J.P., Cazaux S., Bouajila J. ;(2010).**
Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* raddi berries essential oils.
J.Food Sci., **75** : 466-478.
- Bendimerad N., Taleb bendiab S. A., Breme K., Fernandez X. ; (2007).**
Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. From Algérie.
J. Essent. Oil Res., **19** : 206-208.
- Benhammou N., Atikbekkara F., Kadifkova Panovska T. ; (2009).**
Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex Halimus*.
C. R. Chimie, **12** : 1259–1266.
- Benhammou, N., Ghambaza, N., Benabdelkader, S., Atik-Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. ; (2013).**
Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis Articulata*. *International Food Research Journal*, **20(5)** : 2057-2063.
- Benrebiha F Z. ; (1987).**
Contribution a l'étude de la germination de quelques espèces d'*Atriplex* locales et introduites.
Mémoire de magister en sciences agronomiques, institut national agronomique, El-Harrach, Alger.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. ; (1996).**
Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay.
Anal. Biochem., **239** : 70-76.
- Bergogne-Bérézin E., Dellamonica P. ; (1999).**
Antibiothérapie en pratique clinique. 2^{ème} Ed. Masson. Paris. France.
- Bermond, P. ; (1990).**
"Biological effects of food antioxidants. In *Food Antioxidants*, Ed. B.J.F Hudson. London : Elsevier.

- Bernardi M.M., Kirsten T.B., Salzgeber S.A., Ricci E.L., Romoff P., Guilardi Lago J.H., Lourenço L.M. ; (2010).**
Antidepressant-like effects of an apolar extract and chow enriched with *Nepeta Cataria* (Catnip) in mice.
Psychology and Neuroscience, **3(2)** : 251-258.
- Bhat S., Maseshwari P., Kumar S., Kumar A. ; (2002).**
Mentha Species: *In Vitro* Regeneration And Genetic Transformation.
Mol. Biol. Today, **3** : 11-23.
- Bhosale S.H., Jagtap T.G., Nark C.G. ; (1999).**
Antifungal activity of some marine organisms from india against food spoilage *Aspergillus* strains.
Mycologia, **147(3)** : 133–138.
- Bicchi C., Mashaly M., Sandra P. ; (1984).**
Constituents of essential oil of *Nepeta Nepetella*.
Planta Med., 96-97.
- Bighelli A., Casanova J. ; (2009).**
Analytical methods for Cymbopogon oils, *in* essential oil bearing grasses, the genus Cymbopogon.
Taylor and Francis : London 195–215.
- Bottini A.T., Dev V., Garfagnoli D.J., Lohani H., Ma-thela C.S., and Pant A.K. ; (1987).**
(7R)-trans, trans-nepetalactone from *Nepeta elliptica*.
Phytochemistry, **26** : 1200-1202.
- Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M. ; (2009).**
Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases.
Food Chemistry, **114** : 1198-1205.
- Boughalleb N., Trabelsib L., Harzallah-Skhiri F. ; (2009).**
Antifungal activity from polar and non-polar extracts of some Chenopodiaceae wild species growing in Tunisia.
Natural Product Research, **23 (11)** : 988–997.
- Boughalleb N., Débbabi N., Ben Janet H., El Mighri Z., El Mahjoub M. ; (2005).**
Antimicrobial activity of volatile components extracted from leaves, stems and flowers of four wild plants in Tunisia against plant pathogenic fungi.
Phytopathologica Mediterranea, **44** : 307–312.
- Boudida EL.H., Alaoui K., Cherrah Y. ; (2008).**
Action analgésique de différents extraits non volatils de *Nepeta atlantica* Ball Et *Nepeta tuberosa* L. Ssp. *reticulata* (Desf.) Maire.
Thérapie, **63(4)** : 333–338.
- Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G. ; (2007).**
Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha Rotundifolia* du nord de l'Algérie.
Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, **11(1)** : 3-7.
- Brada M., Bezzina M., Marlier M., Lognay G.C. ; (2006).**
Chemical Composition Of The Leaf Oil Of *Mentha Rotundifolia* (L.) From Algeria
J. Essent. Oil Res., **18** : 663–665.

Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J. ;(1996).

L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13.
Canadian J. Appl. Spectrosc., Partie 1, **4** : 15-24, Partie 2, **4**: 41-50.

Braham H., Ben Janet H., Migh Z., Abreu P-M. ; (2007).

Carbohydrates from *Moriandia Arvensis* growing in Tunisia.
Journal de la Société Chimique de Tunisie, **9** : 109-113.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.; (1995).

Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.
Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, **28** : 25-30.

Brophy J.J., Golsack R.J., Lawrence B.M., Forster P.I. ; (1996).

Essential oil of *Mentha Diemenica* (Lamiaceae).
J. Essent. Oil Res., **8** : 179-189.

Bruneton J. ; (1993).

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques Et Documentation, 2^{ème} Ed.
Lavoisier. Paris-France.

Bruneton J. ; (1999).

Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques Et Documentation. 3^{ème} Ed.
Lavoisier. Paris-France.

Burt S. A. ; (2004).

Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods-A rewiew.
International J. of Food Microbiology, **94** : 223-253.

Carré P. ; (1953).

Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3. Ed. Ballière J.B. et Fils.Paris. France.

Castola V., Bighelli A., Casanova J. ; (1999).

Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using ¹³C NMR spectroscopy exemplified by dichloromethanic extracts of cork.
Appl. Spectro., **53** : 344-350.

Castola V., Bighelli A., Casanova J.; (2000).

Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia Lentiscus* L. From Corsica.
Biochem. Syst. Ecol., **28** : 79-88.

Cavin A. ; (1999).

Investigation phytochimique de trios plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires ; *Tinospora Crispa* (Ménispermacées), *Merremia Emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea Enneandra* (Annoncées). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en biochimie, Université de Lausanne-Suisse.

Chalchat J.C., Gorunovic M.S., Petrovic S.D., Maksimovic Z.A. ; (2000).

Composition of the essential oil of *Nepeta Rtanjensis* Diklic Et Milojevic, Lamiaceae from Serbia.
J. Essent. Oil Res., **12** : 238-240.

Chavan, U. D., Shahidi, F. And Naczk, M. ; (2001).

Extraction of condensed tannins from beach Pea (*Lathyrus Maritimus* L.) as affected by different solvents.
Food Chemistry, **75** : 509–512.

Cherif K., Boudrissa A., Cherif M.H., Harrat Z. ; (2012).

Un programme social pour la lutte physique contre la Leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie S.F.S.P.

Santé Publique, **24** : 511- 522.

Chevalier J., Choisy C., Crémieux A., Darbord J. C., Davin-Régli A., Dubreuil L., Finance C., Linxé C., Quentin-Noury C., Quero A. M., Reynaud A. ; (2003).

Microbiologie Générale Et Santé. Ed. Eska. Paris. France.

Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., Chou S.T.; (2002).

Antioxidant activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NKI.

J. Agric. Food Chem., **50** : 2454-2458.

Coene I. ; (2004).

Les antioxydants et l'alimentation, nutrition information center NICE, Symposium, 23 Octobre 2004, Bruxelles, Belgique. Nutrinews, N°4.

Constantin E. ; (1996).

Spectrométrie De Masse. Ed. Lavoisier Tech. et Doc. Paris. France.

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., Maes L. ; (2006).

Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept".

Journal of Ethnopharmacology, **106** : 290-302.

Coste H. ; (2002).

Flore descriptive et illustrée de la France par l'abbé. Ed. Vals-Près-Le Puy. Tome 3 ; Taxon N° 2839. France.

Cotrim H.C., Barroso J C., Figueiredo A.C., Pais M. S.S., Scheffer J.J.C. ; (1994).

Composition of the essential oil from inflorescences of *Nepeta tuberosa* L. ssp. *tuberosa*.

Flav. Fragr. J., **9** : 71-73.

Cowan M.M. ; (1999).

Plant products as antimicrobial agents.

Clinical Microbiology Reviews, **12** : 564-582.

Dai K. ; (1981).

A Preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China.

Acta Pharmaceutica Sinica, **16 (11)** : 849-859.

Dalton, D.A. ; (1995).

Antioxidant defenses of plants and fungi. In: Ahmad S, editor. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. New York: Chapman & Hall. 298–355.

De Feo V., Senatore F. ; (1993).

Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy.

Journal Of Ethnopharmacology, **39** : 39–51.

De Pooter H.L., Bart N., De Buyck L.F., Goetghebeur P., Schamp N.M. ; (1987).

The essential oil of *Nepeta nuda*. Identification of a new nepetalactone diastereoisomer.

Phytochemistry, **26** : 2311-2314.

- Deliorman Orhan D., Özçelik B., Hoşbaş S., Vural M. ; (2012).**
Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi.
Turk. J. Biol., **36** : 672-686.
- Derwich E., Benziane Z Boukir A. ; (2010).**
Antibacterial activity and chemical composition of the Leaf essential oil of *Mentha Rotundifolia* from Morocco.
Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, **9 (1)** : 19-28.
- Diallo, D., Paulsen, B.S., Liljebäck, T.H.A., Michaelsen, T.E. ; (2001).**
Complement fixing activity of polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., *Mimosaceae*.
J. Ethnopharmacol., **74** : 159-171.
- Díaz C., Quesada S., Brenes O., Aguilar G., Ciccio J´.F. ; (2008).**
Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines.
Natural Product Research, **22 (17)** : 1521-1534.
- Dupont F., Guignard J.L. ; (2007).**
Botanique : Systématique Moléculaire. 14^{ème} Ed. Masson, Paris-France.
- Eberhard T., Anton R., Lobstein A. ; (2005).**
Plantes aromatiques. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris-France.
- Economou L., Venskutonis R., Van Beek T.A. ; (1991).**
Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs. *Journal of the Science of Food and agriculture*, **77** : 140-146.
- Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. ; (2005).**
Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants.
African Journal of Biotechnology, **4** : 685-688.
- Ekoumou C. ; (2003).**
Etudes Phytochimiques Et Pharmacologiques De 5 Recettes Traditionnelles Utilisées Dans Le Traitement Des Infections Urinaires Et De La Cystite. Thèse de Pharmacie, Bamako.
- El Arch M, Satrani B, Farah A, Bennani L., Boriky D., Fechtal M., Blaghen M., Talbi M. ; (2003).**
Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha Rotundifolia* du Maroc.
Acta Bot. Gallica, **150** : 267-274.
- Ezzatzadeh E., Fallah Iri Sofla S., Pourghasem E., Rustaiyan A., Zarezadeh A. ; (2014).**
Antimicrobial activity and chemical constituents of the essential oils from root, leaf and aerial part of *Nepeta asterotricha* from Iran.
Journal of Essential Oil Bearing Plants, **17(3)** : 415 – 421.
- Fahey J.W., Zalemann A.T., Talalay P. ; (2001).**
The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants.
Phytochemistry, **56** : 5-51.
- Fain O. ; (2005).**
Les manifestations rhumatologiques du Scorbut.
Revue Du Rhumatisme, **72** : 124-128.

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. ; (2008).**
Phenolic composition of *Cynara Cardunculus* L. Organs, and their biological activities.
Compte Rendu de Biologie, **331** : 372-379.
- Favier A. (2003).**
Le Stress Oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
Actualité Chimique, **novembre-décembre** : 108-115.
- Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. ; (2006).**
The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal.
Journal of Ethnopharmacology, **108** : 31–37.
- Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M.L.M., Araujo M.E.M., (2006).**
The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108 : 31-37.
- Finley, B.,Proctor, D.,Scott, P.,Harrington, N.,Paustenbach, D., Price,P.; (1994).**
Recommended Distributions For Exposure Factors Frequently Used In Health Risk Assessment.
Risk Analysis,**14** : 533-553.
- Flamini G., Luigi Cioni P., Puleio R., Morelli I., Panizzi L. ; (1999).**
Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi.
Phytotherapy Research, **13 (4)** : 349–351.
- Frankel, E.N. ; (1996).**
Antioxidants in lipids and their impact on the food quality.
Food Chem, **57** : 51-55.
- Frankel E.N., Meyer A.S. ; (2000).**
The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.
Journal of the Science of Food and Agriculture, **80 (13)** : 1925-1940.
- Gadano A.B., Gurni A.A., Carballo M.A. ; (2006).**
Argentine Folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family.
Journal of Ethnopharmacology, **103** : 246–251.
- Gaston B. ; (1990).**
La grande flore en couleurs. Ed Belin. Paris. France.
- Ghannadi A., Aghazari F., Mehrabani M., Mohagheghzadeh A., Mehregan I. ; (2003).**
Quantity And composition of the sde prepared essential oil of *Nepeta Macrosiphon* Boiss essential oil composition of *Nepeta Raphanorhiza* Benth growing in Kashmir Valley.
Rec. Nat. Prod., **6 (1)** : 67-70.
- Gibbons S. ; (2008).**
Phytochemicals For Bacterial Resistance-Strengths, Weaknesses And Opportunities.
Planta Medica, **74 (6)** : 594-602.
- Gkinis G., Tzakou Q., Iliopoulou D., Roussis V.Z. ; (2003).**
Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oil sand isolated Nepetalactons.
Naturforsch., **58** : 681-686.

- Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. ; (2006).**
Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **41** : 1220-1234.
- Gormez A., Bozari S., Yanmis D., Gulluce M., Agar G., Sahin F. ; (2013).**
Antibacterial activity and chemical composition of essential oil obtained from *Nepeta nuda* against phytopathogenic bacteria.
Journal of Essential Oil Research., **25(2)** : 149-153.
- Guignard J.L. ; (1979).**
Abrégé De Biochimie Végétale. 2^{ème} Ed Masson. Paris.
- Gulcin I., Alici H.A., Cesur M. ; (2005).**
Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol.
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **53(3)** : 281-285.
- Gupta K., Wagle D.S. ; (1988).**
Nutritional And Antinutritional Factors Of Green Leaf Vegetable.*Journal Of Agric. Food Chem.*, **36**, 472-474.
- H.C.D.S. ; (1996).**
Notice bibliographique sur quelques plantes fourragères et pastorales.haut commissariat du développement de la steppe. 15 P.
- Handjieva N.V., Popon S. S. ; (1996).**
Constituents of essential oils from *Nepeta cataria* L., *N. grandiflora* M. B., and *N. nuda* L.
J. Essent. Oil Res., **8** : 639-43.
- Hanson P.M., Yang R., Wu J., Chen J., Ledesma D., Tsou S.C.S., Lee T.C. ; (2004).**
Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., **129** : 704–711.
- Harborne J.B. ; (1973).**
phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis.2nd Ed, London New York.
- Hassan T., Ur-Rehman S., Bhat B.A., Rather M.A., Bhat K.A., Shawl A.S., Dar G.H. ; (2011).**
Volatile chemical constituents of *Nepeta Raphanorhiza* Benth growing in Kashmir valley.
Journal of Pharmacy Research, **4(9)** : 3128-3129.
- Hayouni E., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J-Y., Hammami M., Hamdi M. ; (2008).**
Tunisian *Salvia Officinalis* L. And *Schinus Molle* L. Essential Oils: Their Chemical Compositions And Their Preservative Effects Against *Salmonella* Inoculated In Minced Beef Meat.
International Journal Of Food Microbiology, **125** : 242–251.
- Hendriks H., Van Os F.H.L. ; (1976).**
Essential oils of two chemotypes of *Mentha suaveolens* during ontogenesis.
Phytochemistry, **15** : 1127-1130.
- Hendriks H., Van Os F.H.L., Feenstra W.J. ; (1976).**
Crossing experiments between some chemotypes of *Mentha longifolia* And *Mentha suaveolens*.
Planta Med, **30**, 154-162.

- Hiramatsu, N., Banno, S., Hirajima, T., And Cong, B. ; (1995)**
 Ultrahigh-Pressure garnet lherzolite from chijiadian, rongcheng county, in the su-lu region of Eastern China.
The Island Arcs, **4** : 324–333.
- Huaman Y., de la Cruz O.A., Bosilcov A., Batiu I. ; (2004).**
 Essential oil from the fruits of *Schinus molle* L. from Peru.
Journal of Essential Oil-Bearing Plants, **7(3)** : 223-227.
- Hubert J., (2006).**
 caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité: qualité et sécurité des aliments.
- Humphries C. ; (1980).**
 Trypsin Inhibitors In Leaf Protein Concentrate.
Journal of Sci. Food Agric., **31**: 1225-1230.
- Hunt S., Smith A.M., Woolhouse H.W. ; (1987).**
 Evidence for a light-dependent system for reassimilation of photorespiratory CO₂, which does not inc a C₄ cycle, in the C₃-C₄ intermediate species *Moricandia arvensis*.
Planta, **171** : 227–234.
- Ibrahim Magda T., Fobbe R., Nolte J. ; (2004).**
 Chemical composition and biological studies of Egyptian *Schinus Molle* L. And *Schinus terebinthifolius* Raddi Oils.
Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University), **42(2)** : 289-296.
- Il Idrissi A., Bellakhdar J. ; (1989).**
 Etude chimiotaxinomique de diverses populations de *Mentha suaveolens* Ehrh. du Maroc : Nouvelles données.
Al Biruniya, **5 (2)** : 79–88.
- Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoğlu M., Baser K.H.C., Demirci F. ; (2002).**
 Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50(14)** : 3943-3946.
- Jahangir M., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. ; (2009).**
 Health-affecting compounds in *Brassicaceae*.
Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **8** : 31-43.
- Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C. ; (2004)**
 Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, **52** : 3389-3393.
- Joffin J.N., Leyral G. ; (2001).**
 Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3^{ème} Ed. Biologie Technique. Bordeaux. France.
- Jones J.D., Dangl J.L. ; (2006).**
 The plant immune system.
Nature, **444** : 323-329.

Joulain D., König W.A. ; (1998).

The Atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. *E. B.- Verlag*, Hamburg.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. ; (2002).

Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1^{ère} Ed De Boeck Université. Paris. France.

Julkunen-Titto, R.; (1985).

phenolic constituents in the leaves of Northern Willows methods for the analysis of certain phenolics.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **33** : 213–217.

Kalemba D., Kunicka A. ; (2003).

Antibacterial and antifungal properties of essential oils.

Curr. Med. Chem., **10** : 813-829.

Kambouche N., Merah B., Derdour A., Bellahouel S., Younos C., Soulimani R. ;(2011).

Activité antihyperglycémiant d'un stérol β -Sitoglucoside isolé de la plante *Anabasis articulata* (Forssk) Moq.

Phytothérapie, **9** : 2–6.

Karaman S., Comlekç Io Go Lu N. ; (2007).

Essential Oil Composition Of *Nepeta Cilia* Boiss. Apud bentham and *Phlomis Viscosa* Poiret from turke.

International Journal Of Botany, **3(1)** : 122-124.

Kassemi N., Khelil M. A., Bendimerad N. ; (2013).

Evaluation of the insecticidal activity of the aerial part of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb) Rehder on grain borer, *Rhyzopertha dominica* Fab. (Bostrychidae) and wheat weevil, *Sitophilus granarius* Linn. (Curculionidae),

Journal of Life Sciences, **7(7)** : 700-704.

Kaur C. Kapoor H.C. ; (2002).

Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables.

International Journal of Food Science and Technology, **37** : 153-161.

Khadraoui A., Khelifa A., Hamitouche H., Mehdaoui R. ; (2014).

Inhibitive effect by extract of *Mentha rotundifolia* leaves on the corrosion of steel in 1 M Hcl solution.

Research on Chemical Intermediates, **40** : 961-972.

Khan Shinwari Z., Nisar A., Javid H., Ur Rehman N. ; (2013).

Antimicrobial evaluation and proximate profile of *Nepeta leavigata*, *Nepeta kurramensis* and *Rhynchosia reniformis* Pak.

J. Bot., **45(1)** : 253-259.

Kishore N., Mishra A.K., Chansouria J.P. ; (1993).

Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes.

Mycoses, **36 (5-6)** : 211-215.

Kökdil G., Kururu S., Topcu G. ; (1996).

Composition of the essential oil of *Nepeta nuda* L. ssp. *Albiflora* (Boiss.) Gams.

Flav. Fragr. J., **11** : 167-169.

Kökdil G., Kururu S., Topcu G. ; (1997).

Chemical constituents of the essential oils of *Nepeta italica* L., and *Nepeta sulfuriflora* P. H. Davis. *Flav. Fragr. J.*, **12** : 33-35.

Kokkini S., Papageorgiou V. ; (1988).

Constituents of essential oils from *Mentha rotundifolia* growing wild in Greece. *Planta Med.*, **54** : 166-167.

Kokkini S., Vokou D., (1989).

Mentha spicata (Lamiaceae) chemotypes growing wild in Greece. *Econ. Bot.*, **4** : 192-202.

Koleva II, Teris A.B., Jozef P.H., Linssen A.G., Lyuba N.E. ; (2002).

Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, **13(1)** : 8-17.

Kováts E. ; (1965).

Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.*, **1**: 229-247.

König W.A., Hochmuth D.H. Joulain D. ; (2001).

Terpenoids And Related Constituents Of Essential Oils, Library Of Massfinder 2.1. University Of Hamburg, Institute Of Organic Chemistry, Hamburg.

Kumaran A., Karunakaran R.J. ; (2007).

In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **40** : 344-352.

Ladjet S., Gherraf N., and Hamada D. ; (2011).

Antimicrobial effect of essential oils from the Algerian Medicinal plant *Mentha rotundifolia* L. *Journal of Applied Sciences Research*, **7(11)** : 1665-1667.

Lange B.M., Croteau R. ; (1999).

Genetic engineering of essential oil production in Mint. *Curr. Opin. Plant Biotechnol.*, **2** : 139-144.

Lawrence B. ; (1978).

A study of the monoterpene interrelations in the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran? Phd Thesis, Rijks Universiteit, Groningen.

Lawrence B.M. ; (2007).

Mint: The genus *Mentha*. Tylor and Francis Group, Boca Raton, London New York.

Le Floch E. ; (1983).

Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne; Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique: Tunis.

Leclerc H. ; (1988).

Précis de phytothérapie. Ed Masson-Paris. France.

Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W., Chen F. ; (2008).

Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT –Food. Sci. Technol.*, **41** : 385-390.

Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F.; (2006).

Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions.

Journal of the Science of Food and Agriculture, **86(3)** : 477-485.

Linden G., Et Lovient D. ; (1994).

Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson-Paris. France.

Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. ; (2009).

Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from ilex Kudingcha C.J. *Tesng*.

Food Chemistry, **112** : 35-40.

Ljaljević Grbić M., Vukojević J., Soković M., Grubišić D., Ristić M. ; (2007).

The effect of *Nepeta rtanjensis* essential oil on test *Micromyces mycelia* growth.

Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad., **113** : 173-177.

Longevialle P. ; (1981).

Spectrométrie de masse des substances organiques. Ed. Masson. Paris. France.

Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Canigual S. ; (2002).

Essential Oils Of *Mentha Pulegium* And *Mentha Rotundifolia* From Uruguay.

Brazilian Archives of Biology and Technology, **45** : 519-524.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. ; (2005).

Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed presses polytechnologiques et universitaires Romandes.

Maffei M. ; (1988).

Achemotype of *Mentha longifolia* (L.) Hudson particularly rich in Piperitenone Oxide.

Flav.Frag. J., **3** : 23-26.

Maggi F., Bramucci M., Cecchini C., Coman M.M., Cresci A., Cristalli G., Lupidi G., Papa F., Quassinti L., Sagratini G., Vittori S. ; (2009).

Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations.

Fitoterapia, **80** : 313-319.

Mahasneh A.M., Abbas J.A., El-Oqlah A.A. ; (1998).

Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain.

Phytotherapy Research, **10(3)** : 251-253.

Maire R. ; (1976).

Flore De l'Afrique du Nord, Vol.XIV: Dicotyledonae : Rhoeadales, Sarracéniales, Rosales. Ed. Le Chevalier. Paris. France.

Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z. ; (2007).

Antioxidant and antimicrobial activity of Guarana seed extracts.

Food Chemistry, **104** : 1258-1268.

Mansour F., Azaizeh H., Saad B., Tadmor Y., Abo-Moch F., Said O. ; (2004).

The potential of Middle Eastern flora as a source of new safe Bio-Acaricides to control *Tetranychuscinnabarinus*, The Carmine spider mite.

Phytoparasitica, **32(1)** : 66-72.

Marongiu B., Porcedda A.P.S., Casu R., Pierucci P. ; (2004).

Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L.
Flavour and Fragr. J., **19** : 554-558.

Martin A. J. P., Synge R. L. ; (1941).

A new form of chromatogram employing two liquide phases. 1. A theryory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of higher Monoaminoacids in proteins.
Biochem. J., **35** : 1358-1368.

Martins M.d.R., Arantes S., Candeias F., Tinoco M.T., Cruz-Morais J. ; (2014).

Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils.
Journal of Ethnopharmacology, **151(1)** : 485-492.

Maurice N. ; (1997).

L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris.

Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X. ; (2013).

Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L.
Journal of Medicinal Plants Research, **4(10)** : 959-964.

Mc Lafferty F. W., Stauffer D. B. ; (1994).

Wiley registry of mass data. 6th Ed. Mass Spectrometry Library Search System Benchtop/PBM, Version 3.10d. Palasade Co., Newfield.

Mehrabani M., Asadipour A., Saber-Amoli S. ; (2004).

Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta depauperata* Benth. From Iran.
DARU, **12(3)** : 98-100.

Memelink J., Verpoort R., Kijine J.W. ; (2001).

Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.
Trends In Plant Science, **6** : 212-221.

Misra L.N., Tyagi B.R., Thakur R.S. ; (1989).

Chemotypic variation in Indian spearmint.
Planta Med., **55** : 575-576.

Mohammed A.D., Alqasoumi S.I., Radwanm.A., Burand J., Craker LE. ; (2012).

Phytochemical screening and insecticidal activity of three plants from Chenopodiaceae family.
Journal Of Medicinal Plants Research, **6(48)** : 5863-5867.

Moreno L., Bello R., Primo-Yufero E., Esplugues J. ; (2002).

Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh.
Phytotherapy Research, **16** : 10-13.

Mothana R.A. ; (2012).

Chemical Composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta deflersiana* growing in Yemen
Records of Natural Products, **6(2)** : 189-193.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C. ;(2001).

Natural antioxidants from residual sources.
Food Chemistry, **72** : 145-171.

Mulas M., Mulas G. ; (2004).

Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Ed. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP).

Murray A., Gurovic M., Rodriguez S., Murray M., Ferrero A. ; (2009).

Acetylcholin esterase inhibition and antioxidant activity of essential oils from *Schinus areira* L. and *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg.
Nat. Prod. Commun., **4** : 873–876.

Nagell A., Hefendehl F.W. ; (1974).

Zusammensetzung Des Atherischen Öles Vom *Mentha rotundifolia*.
Planta Med, **26** : 1-8.

Naghbi F., Mosaddegh M., Motamed S-M, Ghorbani A. ; (2005).

Labiatae family in folk medicine in Iran: From ethnobotany to pharmacology.
Iranian Journal of Pharmaceutical Research, **2** : 63-79.

Nagy S., Telek L., Hall N.T., Berry R.E. ; (1978).

Potential food uses for protein from Tropical and Subtropical plant leaves.
Journal of Agric. Food Chem., **26(5)** : 1016-1028.

Namiki, M. ; (1990).

Antioxidants / Antimutagens in food.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **29** : 273–300.

National Institute Of Standards And Technology. ; (1999).

PC Version 1.7 Of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library.
The Perkin Elmer Corporation.

Nazar A.O., Badiaà M.A., Fawzia M.R., Zohair H.M. ; (1998) .

Insecticidal activity and ovipcidal effects of the seed extract of *Atriplex canescens* against *Culex Quinque Fasciatus*.
Pharmaceut. Biol., **36(1)** : 69-71.

Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. ; (2008).

Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. Iran.
J. Pharm. Res., **7 (3)** : 203–209.

Nkhili E. ; (2009).

Polyphénols de l'alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France.

Oana C.C., Zanoaga C.V. ; (2005).

Some aspects on the soil-plant relation in *Nepeta nepetella*
Analele Științifice Ale Universității, Alexandru Ioan Cuza”, *Genetică Și Biologie Moleculară*, **TOM V**: 87-90.

Okusa P.N., Penge O., Devleeschouwer M., Duez P. ; (2007).

Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae).
J. Ethnopharmacol, **112** : 476–481.

Olafsson K., Jaroszewski J.W., Smitt U.W., Nyman U. ; (1997).

Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*.
Planta Med., **63** : 352–355.

Ouzmil H., Ghouлами S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M., Benjouad A. ; (2002).

Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*.
Phytother. Res., **16** : 727-731.

Oyaizu, M. ; (1986).

Studies on products of browning Reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine.
Japanese J. of Nutrition, **44** : 307–315.

Ozenda P. ; (1958).

Flore Du Sahara. Ed. CNRS. Paris, France.

Ozenda P. ; (1977).

Flore du Sahara. Ed. CNRS. PARIS. France.

Ozturk M., Ozturk F.A., Duru M.E., Topcu G. ; (2007).

Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant.
Food Chemistry, **103** : 623-630.

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J. ; (2002).

Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled mediterranean herbs and aromatic plants.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50** : 6882–6890.

Peláez F., Collado J., Arenal F., Basilio A., Cabello A., Díezmatas M.T., García J.B., González Del Val A., González V., Gorrochategui J., Hernández P., Martín I., Platas G., Vicente F. ; (1998).

Endophytic Fungi From Plants Living On Gypsum Soils As A Source Of Secondary Metabolites With Antimicrobial Activity.
Mycological Research, **102** : 755-761.

Pessini G.L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D.A.G. (2003).

Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper Regnelli* (Miq).C.D.C. Var. *Pallescens* (C.D.C). Yunk.
Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, P 98.

Pfaller M.A., Messer S.A., Karlsson Å., Bolmström A. ; (1998).

Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media.
Journal of Clinical Microbiology, **36** : 2586-2589.

Pharmacopée Européenne. ; (2002).

Méthodes physiques et physico-chimiques. P 48.

Pino J.A., Rosado A., Fuentes V. ; (1996).

Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba.
J. Essent. Oil Res., **8** : 295-296.

Podsedek A. ; (2007).

Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review.
LWT - Food Science And Technology, **40** : 1-11.

Pottier-Alapetite G. ; (1979).

Flore De La Tunisie. Ed. Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique Et Ministère De l'Agriculture, Tunis, **210**.

Prieto P., Pineda M, And Aguilar M.; (1999).

Spectrophotometric Quantitation Of Antioxidant Capacity Through The Formation Of A Phosphomolybdenum Complex: Specific Application To The Determination Of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, **269** : 337-341.

Prior R.L., Wu X., Schaich K. ; (2005).

Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53(10)** : 4290-4302.

Qasem J.R., Abu-Blan H. ; (1996).

Fungicidal Activity Of Some Common Leed Extracts Against Different Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathologische Zeitschrift*.

Journal Of Phytopathology, **144(3)** : 157–161.

Quézel P., Santa S. ; (1963).

Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .Tome II. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. France.

Quiroga E.N., Sampietro A.R., Vattuone M.A. ; (2001).

Screening antifungal activities of selected medicinal plants.

J. Ethnopharmacol., **74** : 89-96.

Rabbani M., Sajjadi S. E., Mohammadi A. ; (2008).

Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. In mice.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, **5(2)** : 181-186.

Ramarathnam N, Osawa T, Hiroto O., Kawakishi S. ; (1995).

The contribution of plant food antioxidants to human health.

Trends in Food Science and Techno., **6** : 75–82.

Rather M.A., Hassan T., Dar B.A., Shawl A.S., Qurishi M.A., Ganai B.A. ; (2012).

Essential oil composition Of *Nepeta raphanorhiza* Benth growing in Kashmir valley.

Rec. Nat. Prod., **6(1)**: 67-70

Rawsthorne S., Hylton C.M., Smith A.M., Woolhouse H.W. ; (1988a).

Photorespiratory metabolism and immunogold localization of photorespiratory enzymes in leaves of C₃ and C₃-C₄ intermediate species of *Moricandia*.

Planta, **173** : 298–308.

Rawsthorne S., Hylton C.M., Smith A.M., Woolhouse H.W. ; (1988b).

Distribution of photorespiratory enzymes between bundle-sheath and mesophyll cells in leaves of the C₃-C₄ intermediate species *Moricandia arvensis* (L.) DC.

Planta, **176** : 527–532.

Regnier F.E., Waller G.R., Eisenbraun E.J. ; (1967).

Studies on the composition of the essential oils of three *Nepeta* species.

Phytochemistry, **6** : 1281-1289.

Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. ; (2002).

Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ^{13}C NMR spectroscopy: Application to the analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*.
Appl. Spectro., **56** : 312-317.

Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. ; (2005).

Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* Ssp *Laricio* from Corsica.
Ind. Crops Production, **21** : 65-69.

Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., Chograni H., Zaouali Y., Zoghلامي N., Mliki A. ; (2013).

Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia.
Industrial Crops and Products, **49** : 883– 889

Rios J.L., Recio M.C. ; (2005).

Medicinal plants and antimicrobial activity.
Journal of Ethnopharmacology, **100** : 80-84.

Rolland Y. ; (2004).

Actualités Des Lipides En Cosmétique : Antioxydants Naturels Végétaux.
O.C.L., **11(6)** : 419 – 424.

Rosas M.R. ; (1989).

El Genero *atriplex* (*Chenopodiaceae*) En Chile.
Gayana Bot., **46 (1-2)** : 82-83.

Rossi P.G. ; (2003).

Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles. Université de Corse.

Rossini C., Menendez P., Dellacassa E., Moyna P. ; (1996).

Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan origin.
Journal of Essential Oil Research, **8(1)** : 71-73.

Rousseau D. P. L., Vanrolleghem P. A., Pauw N. D. ; (2004).

Model-based design of horizontal subsurface flow constructed treatment wetlands: A Review.
Water Res., **38** : 1484–1493.

Ruffa M.J., Ferraro G., Wgner M.L. Calcagno M.L., Campos R.H., Cavallaro L. ; (2002).

Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line.
J. Ethnopharmacol., **79** : 335-0339.

Rumbaugh K. P., Griswoldt R. T., Hamood N. ; (1999).

Pseudomonas aeruginosa strains obtained from patterns with tracheal urinary tract and infection variation in virulence factors and virulence.
J. of Hospital Infection, **43** : 211-218.

Rustaiyan A., Komeilizadeh H., Monfared A., Nadji K. Masoudi S., Yari M. ; (2000a).

Volatile constituents of *Nepeta denudata* Benth., and *N. cephalotes* Boiss. from Iran.
J. Essent. Oil Res., **11** : 459-461.

Rustaiyan A., Khosravi M., Larijany K. ; (2000b).

Composition of the essential oil of *Nepeta racemosa* Lam. from Iran.
J. Essent. Oil Res., **12** : 151-152.

Rustaiyan A., Monfared A., Masoudi S. ; (1999).

Composition of the essential oil of *Nepeta asterotri chus* Rech. F. et Aell. from Iran.
J. Essent. Oil Res., **11** : 229-230.

Rustaiyan A., Nadji K. ; (1999).

Composition of the essential oils of *Nepeta ispahanica* Boiss., and *Nepeta binaludensis* Jamzard from Iran.
Flav. Fragr. J., **14** : 35-37.

Safaei-Ghomi J., Ebrahimabadi A.H., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H.; (2009).

GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol.
Food Chemistry, **115(4)** : 1524-1528.

Sajjadi S.E. ; (2005).

Analysis of the essential oil of *Nepeta sintenisii* Bornm. from Iran.
DARU, **13(2)** : 61-64.

Salazar-Aranda R., Pérez-López L.A., López-Arroyo J., Alanís-Garza B.A., Torres N. W.d. ; (2011).

Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico.
Evid. Based Complement. Alternat. Med., Article ID **536139**, 6 p.

Salehi P., Sonboli A., Eftekhar F., Nejad-Ebrahimi S., Yousefzadi M. ; (2005).

Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinipodioides* subsp. *rigida* (Boiss.) Rech. F. from Iran.
Biol. Pharm. Bull., **28** : 1892-1896.

Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A. ; (2008).

Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain Radioprotective plant extract.
Food Chemistry, **106** : 868-873.

Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. ; (1998).

A Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.
Journal Sci. Technology International, **8** : 121-137.

Savangika G., Ohshima M.; 1987.

Application of in-vitro methods to assess the nutritive value of leaf protein concentration.
Journal of Agric. Food Chem., **35** : 82-85.

Schmourlo G., Mendonça-Filho R.R., Alviano C.S., Costa S.S. ; (2005).

Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants.
J. Ethnopharmacol., **96** : 563-568.

Schulz O.E. ; (1936).

In Cruciferae; Engler, A. Eds.; Die Natürlichen Pflanzenfamilien, **2**, 17 B, Engelmann: Leipzig, Germany.

Shimizu S. ; (1956).

Studies of the essential oil of *Mentha rotundifolia* Part I. Isolation of Rotundifolone, a new terpenic ketone.
Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., **20(2)** : 84-88.

Singleton V.L., Rossi J.A. ; (1965).

Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.
American Journal of Enology and Viticulture, **16** : 144.

Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. ; (1995).

Antimicrobial activity of mint essential oils.
J. Agric. Food Chem., **43** : 2384-2388.

Skaltsa H.D., Lazari D.M., Loukis A.E., Costan-Tinidis T. ; (2000).

Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory et Chaub. subsp. *argolica* (Lamiaceae) growing wild in Greece.
Flav. Fragr. J., **15** : 96-99.

Skandrani I., Boubaker J., Bouhlel I., Limem I., Ghedira K., Ghedira L.C. ; (2010).

Leaf and root extracts *Moricandia arvensis* protect against DNA damage in human lymphoblast cell and enhance antioxidant activity.
Environmental Toxicology And Pharmacology, **30** : 61-67.

Somon A. ; (1987).

Arbes, Arbustes Et Arbissaux En Algérie. O.P.U, Alger.

Song J.H. ; (2008).

What's new on the antimicrobial horizon?
International Journal of Antimicrobial Agents, **32** (4) : 207-213.

Souri E., Farsam H., Sarkheil P., Ebadi F. ; (2004).

Antioxidant activity of some furanocoumarins isolated from *Heracleum persicum*.
Pharmaceut. Biol., **42** : 396-399.

Souri E., Amin G., Farsam H., Barazandeh Tehrani M. ; (2008).

Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts.
DARU, **16** : 83-87.

Srifi A., Rahmouni B., Boudida El H., Alaoui K., Cherrah Y., Il Idrissi A., El Mellouki W., Bouchrik M., Lmimouni B. ; (2013).

Etude phytochimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc.
Phytothérapie, **11** (3) : 161-171.

Sun D.J., He Z.H., Xia X.C., Zhang L.P., Morris C.F., Appels R., Ma W.J., Wang H. ; (2005).

A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat.
Mol. Breeding., **16** : 209-218.

Sutour S., Bradesi P., Casanova J., Tomi F. ; (2010).

Composition and chemical variability of *Mentha suaveolens* Ssp. *Suaveolens* And *M. suaveolens* Ssp. *Insularis* From Corsica.
Chemistry and Biodiversity, **7** : 1002-1008.

Tahir M., Watts R. ; (2011).

Moricandia.
Wild Crop Relatives : Genomic and Breeding Resources, **2**(12) : 191-198.

Tappel A., Moller L. ; (1996).

Glutathion Peroxidase and other Selenoproteinler. Ed. VAN Nostrand Co. New York.

Taylor, L. ; (2005).

The healing power of rainforest herbs. a guide to understanding and using herbal medicinals. Ed. Square One Publishers. New York.

Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP.; (2012).

Investigations Of Antimicrobial Activity Of Some Cameroonian Medicinal Plant Extracts Against Bacteria And Yeast With Gastrointestinal Relevance.

Journal Of Ethnopharmacology, **142** , 265-273.

Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J. ; (1995).

Computer-Aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy.

J. Magn. Reson. Anal., **1** : 25-34.

Tomi F., Casanova J. ; (2006).

¹³C NMR As a tool for identification of individual, components of essential oils Labiatae.

Acta Hort., **723** : 185-192.

Toriyama K., Hinata K., Kameya T. ; (1987).

Production of somatic hybrid plants, Brassicomoricandia", through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*.

Plant Science, **48(2)** : 123-128.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C. ; (2010).

Solvent Effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum Monopetalum* leaves.

Food Science And Technology, **43(4)** : 632-639.

Traoré M. C. ; (2005).

Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse De Doctorat. Université De Bamako, Mali.

Trease E., Evans W.C. ; (1987).

Pharmacognosy billiaire. Ed. Billiaire. Tindall-London.

Tsuruokaa T., Bekh-Ochira D., Katoa F., Sanduinb S., Shatarynb A., Ayurzanac A., Satoud T., Lid W., Koiked K. ; (2012).

The essential oil of Mongolian *Nepeta sibirica*: a single component and its biological activities.

Journal of Essential Oil Research, **24(6)** : 555–559.

Tzakou O., Harvala C., Galati E.M., And Sanogo R. ; (2000).

Essential oil composition of *Nepeta argolica* Bory Et Chaub. Subsp. Argolica.

Flav. Fragr. J., **15** : 115-118.

Umemoto K. ; (1998).

Two new stereoisomers of 1,2-Epoymenthyl Acetate from self-pollinated plant oils of *Mentha rotundifolia*.

Nat. Prod. Lett., **11** : 161-165.

Vansant G. ; (2004).

Radicaux libres et antioxydants: principe de base.

Symposium «Antioxydant et Alimentation». Institut Danone.

- Vardar-Ünlü G., Candan F., Sökmen A., Daferera D., Polissiou M., Sökmen M., Dönmez E., Tepe B. ; (2003).**
Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51** (1) : 63-67.
- Velasco-Negueruela A., Perez-Alonso M.J., Rodriguez A.B. ; (1989).**
Essential oil analysis of *Nepeta teydea* Webb. & Berth.
Flav. Fragr. J., **4** : 197-199.
- Velasco-Negueruela A., Pérez-Alonso M.J., Buades Rodríguez A. ; (1990).**
Continuación del estudio químico de los aceites esenciales De Nepetas Ibéricas: *Nepeta Nnepetella* L. Y *N. Amethystina* Poiret.
Anales Jard. Bot. Madrid, **47**(2) : 395-400.
- Velasco-Negueruela A., Rico M.M., Benito P.B., Perez-Alonso M.J. ; (1998).**
Composicion de los aceites esenciales de *Nepeta nepetella* Subsp. *Aragonensis*, *Nepeta coerulea* Subsp. *Coerulea* Y *Nepeta cataria*. *Giorn.*
Bot. Ital., **122** : 295-302.
- Venskutonis P.R. ; (1996).**
A chemotype of *Mentha longilia* L. from Lituania rich in Piperitenone Oxide.
J. Essent. Oil Res., **8** : 91-95.
- Vernin G., Boniface C., Metzger J., Ghiglione C., Hammoud A., Suon K. N., Fraisse D., Párkányi C. ; (1888).**
GC-MS-specma bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries.
J. of Phytochemistry, **27** : 1061-1064.
- Vernin G., Petitjean M., Poite J.C., Metzger J., Fraisse D., Suon K.N. ; (1986).**
Mass spectra and Kováts indices data bank of volatile aroma compounds, Chapitre VII in Computer aids to chemistry. Vernin G., Chanon M ed., Horwood E., Pub., Chilchester : 294-333.
- Warwick S.I., Francis A., La Flèche J. ; (2000).**
In Guide To Wild Germplasm Of *Brassica* And Allied Crops (Tribe *Brassicaceae*, *Brassicaceae*). 2nd Ed. Electronic Product Published By Agriculture And Agri-Food Canada, Eastern Cereal And Oil seed Research Centre: Ottawa. Canada.
- Yueqin Z., Recio M.C., M.Nez S., Giner R.M., Cerd.-Nicol.S M., R.Os J. ; (2003).**
Isolation of two Triterpenoids and a Biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits.
Planta Med., **69** : 893-898.
- Zahed N., Hosni K., Brahim N.B., Kallel M., Sebei H. ; (2010).**
Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination.
Acta. Physiol. Plant., **32** : 1221-1227.
- Zekri N., Sabri H., Khannouchi S., El Belghiti M.A., Zair T. ; (2013).**
Phytochemical study and fumigant toxicity of *Mentha suaveolens* Ehrh essential oil from Morocco against adults of *S. oryzae* (L.).
Australian Journal of Basic and Applied Sciences, **7**(14) : 599-606.
- Zeraib A., Ramdani M., Lograda T., Chalard P., Figueredo G. ; (2011).**
Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Moricandia arvensis* L.(DC.).
Asian Journal of Plant Sciences, **10**(6) : 342-349.

Zhang S.Y., Zheng C.G., Yan X.Y., Tian W.X. ; (2008).

Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells.

Biochemical and Biophysical Research Communication, **371** : 654-658.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. ; (1999).

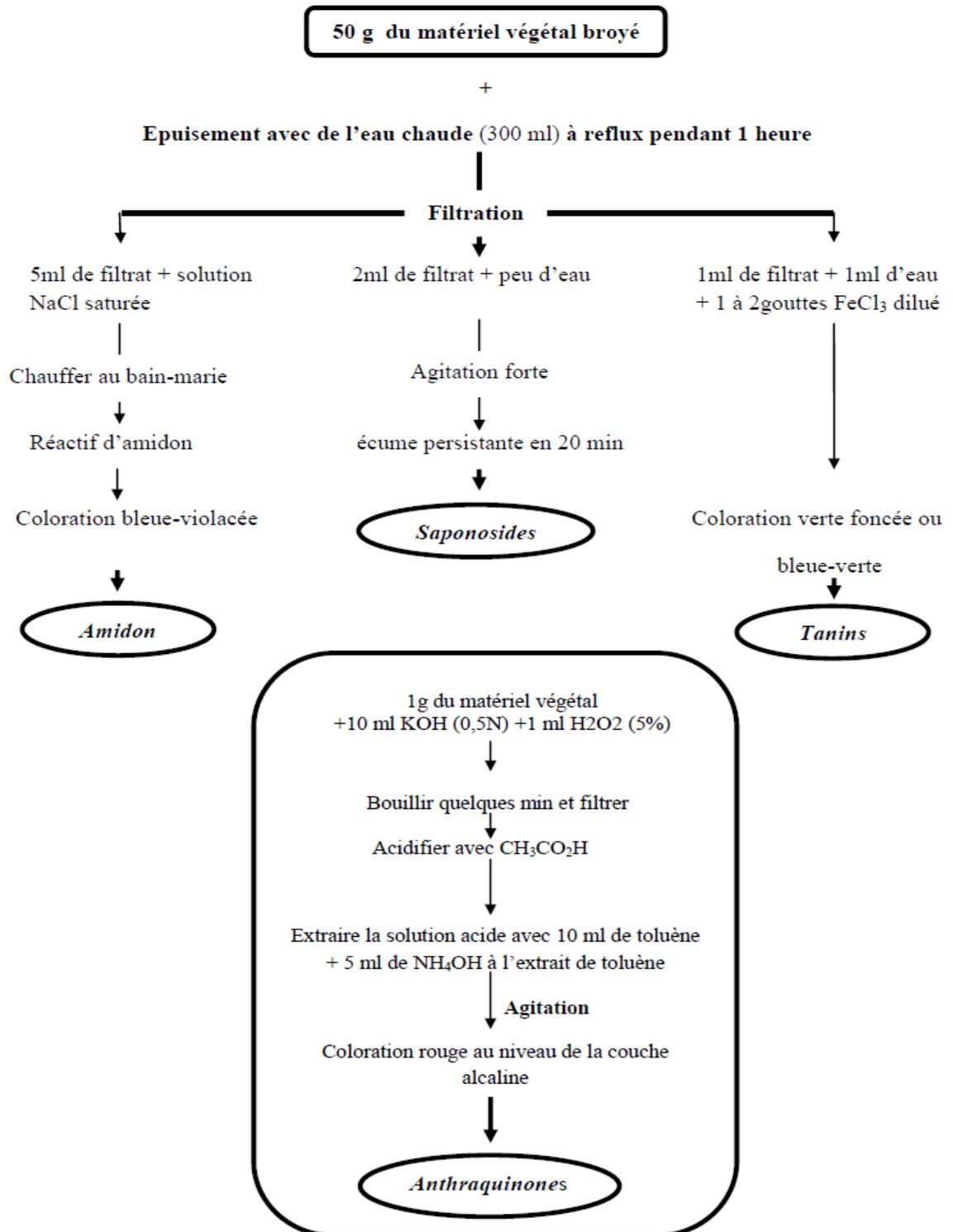
The determination of flavonoids contents in muiberry and their scavenging effects on Superoxide radicals.

Food Chem., **64(4)** : 555-559.

Annexes

Annexe A : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

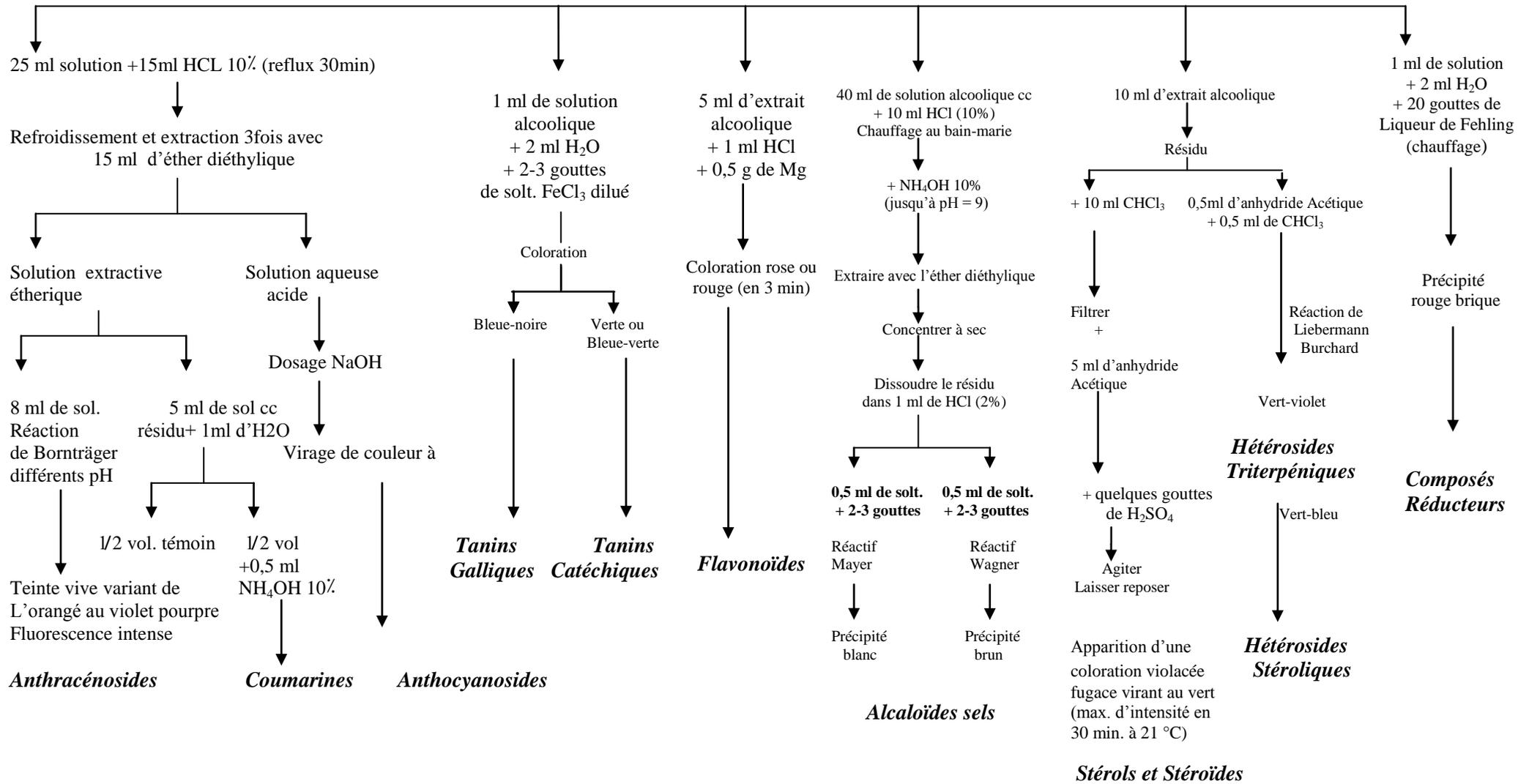


Annexe B : Tests phytochimiques
Épuisement du matériel végétal avec
de l'éthanol

50 g du matériel végétal + 300ml d'éthanol

Reflux pendant 1 heure.

Filtration



Annexe C : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'éther diéthylique

50 g du matériel végétal broyé

+

Epuisement avec l'éther diéthylique (300 ml) à reflux pendant 1 heure.**Filtration**10 ml de solution
EvaporéeRésidu+1 ml NH₄OH

Réaction de Bornträger

Teinte vive

Variant de l'orangé-rouge
au violet pourpre*Alcaloïdes base*20 ml de solution
concentrée

Résidu+ alcool

Solution alcoolique

Concentration à sec

*Huiles volatiles*20 ml de solution
étherique

Résidu + Alcool

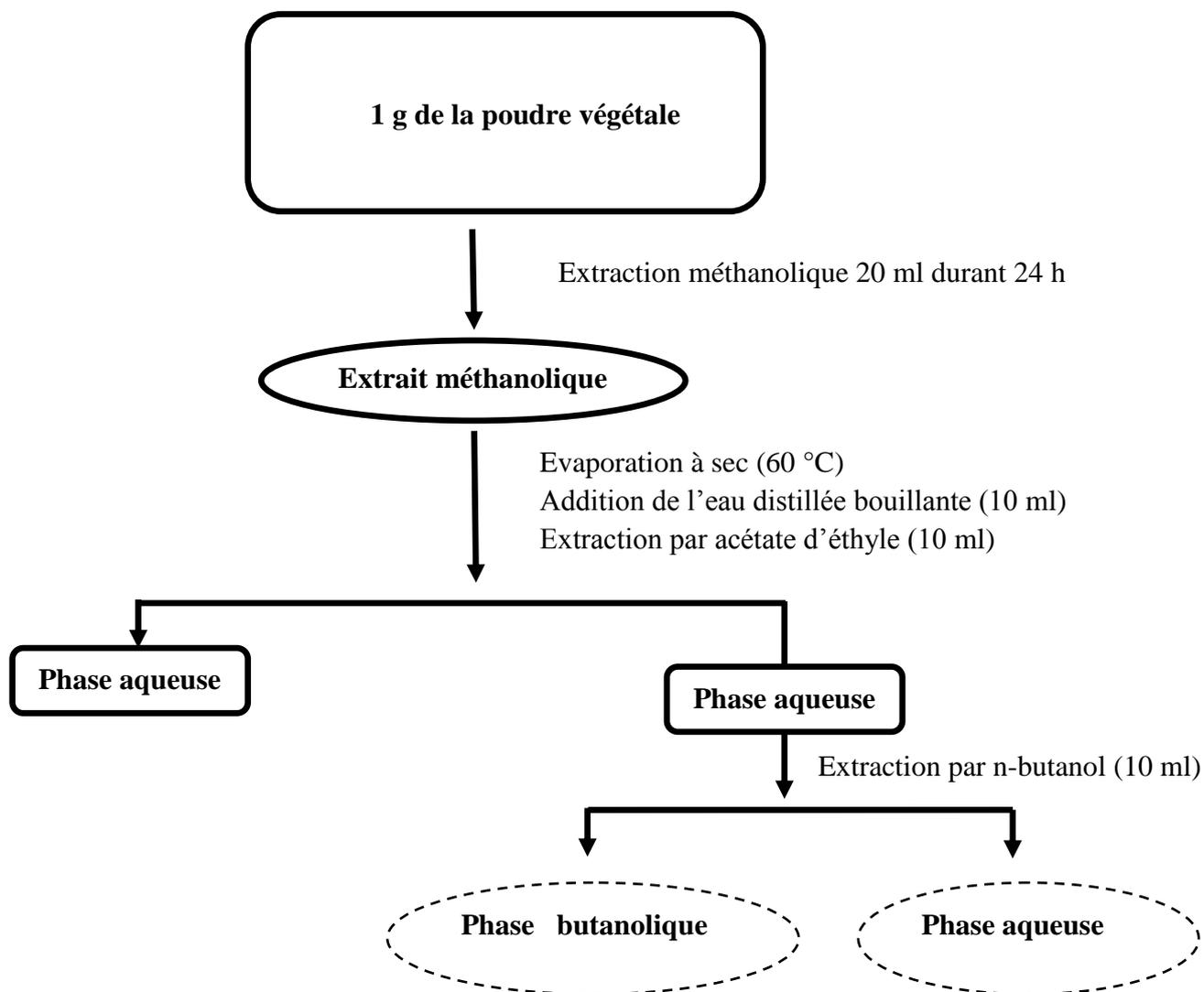
Solution alcoolique

le résidu gras se saponifie
(hydrolyse d'ester présence d'une
base soude ou potasse)Ajouter un peu d'eau extraire la
solution avec l'éther diéthylique

Concentrer à sec

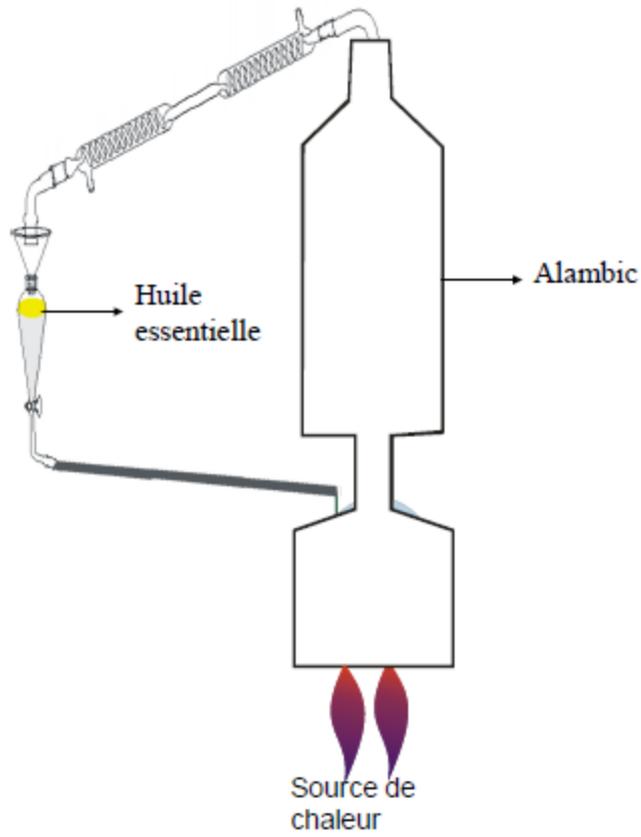
Acides gras

Annexe D : Schéma d'extraction des fractions acétate d'éthyle et n-butanol

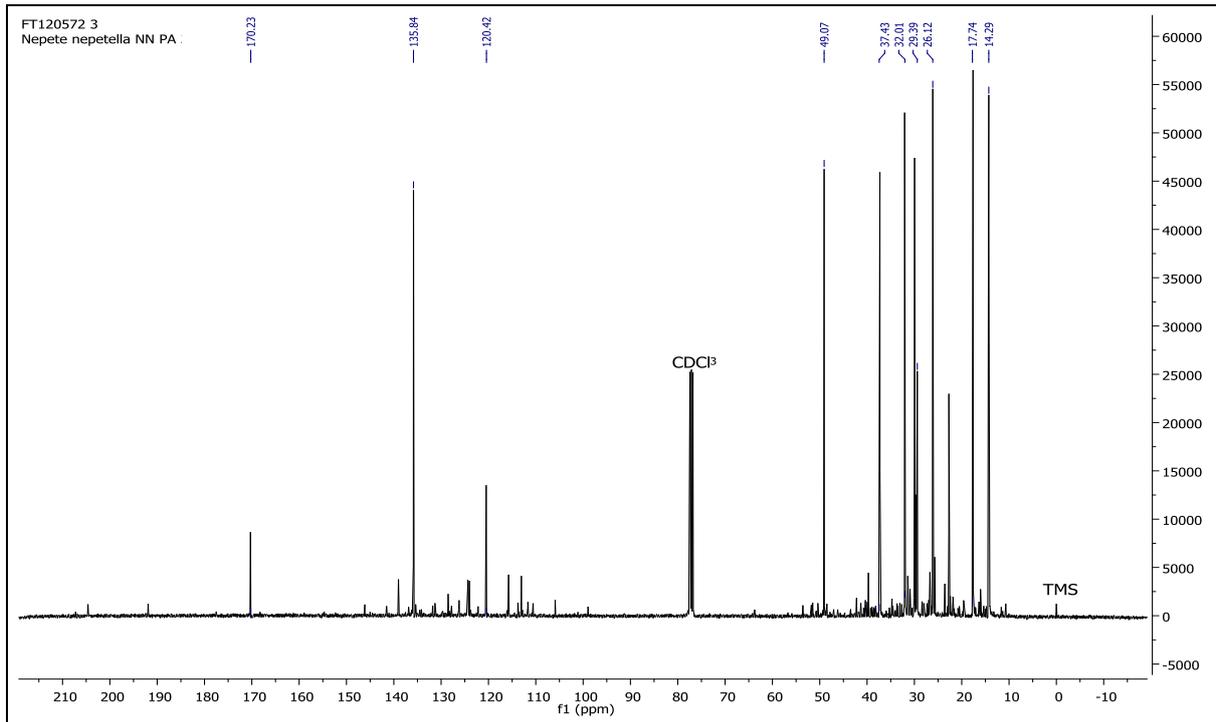
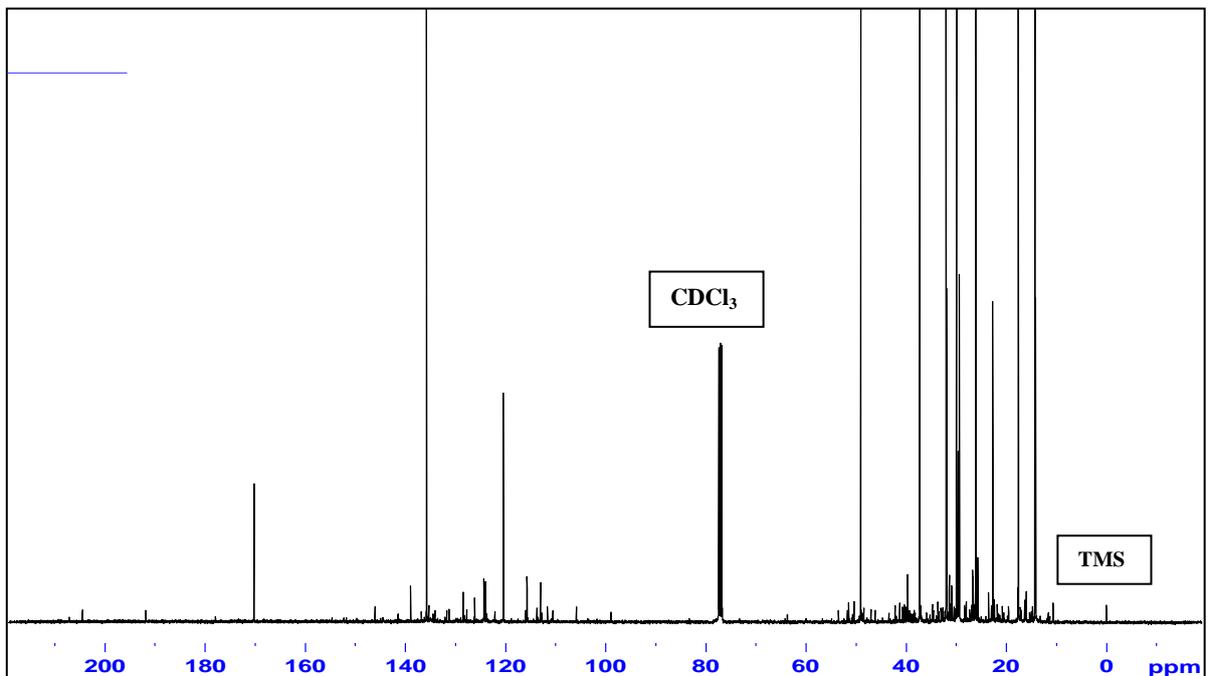


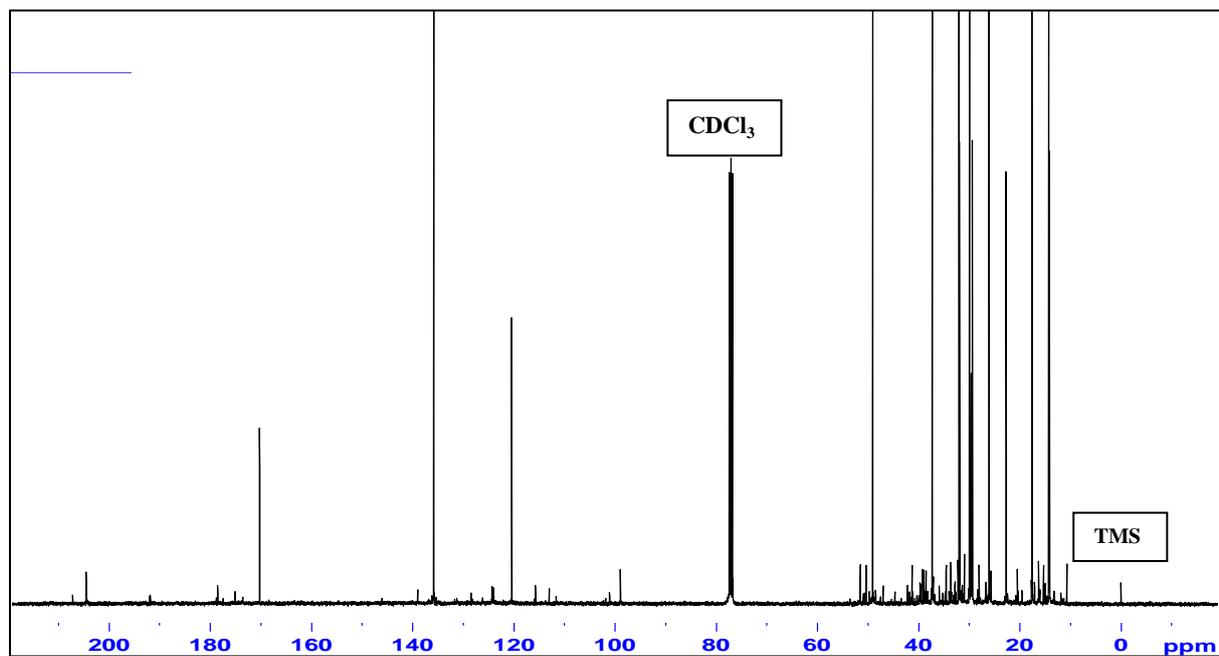
(Bekkara et al., 1998)

Annexe E : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau).

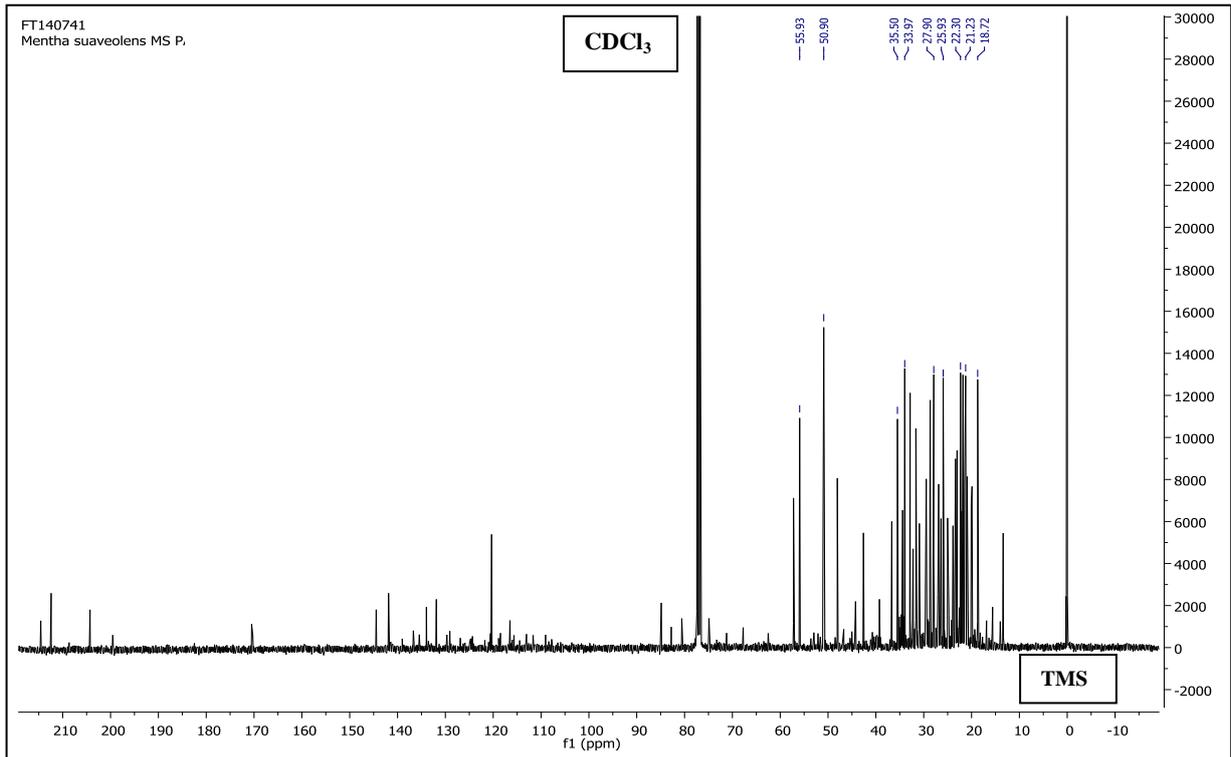


Annexe F : Spectres de RMN du carbone-13 des différentes espèces végétales

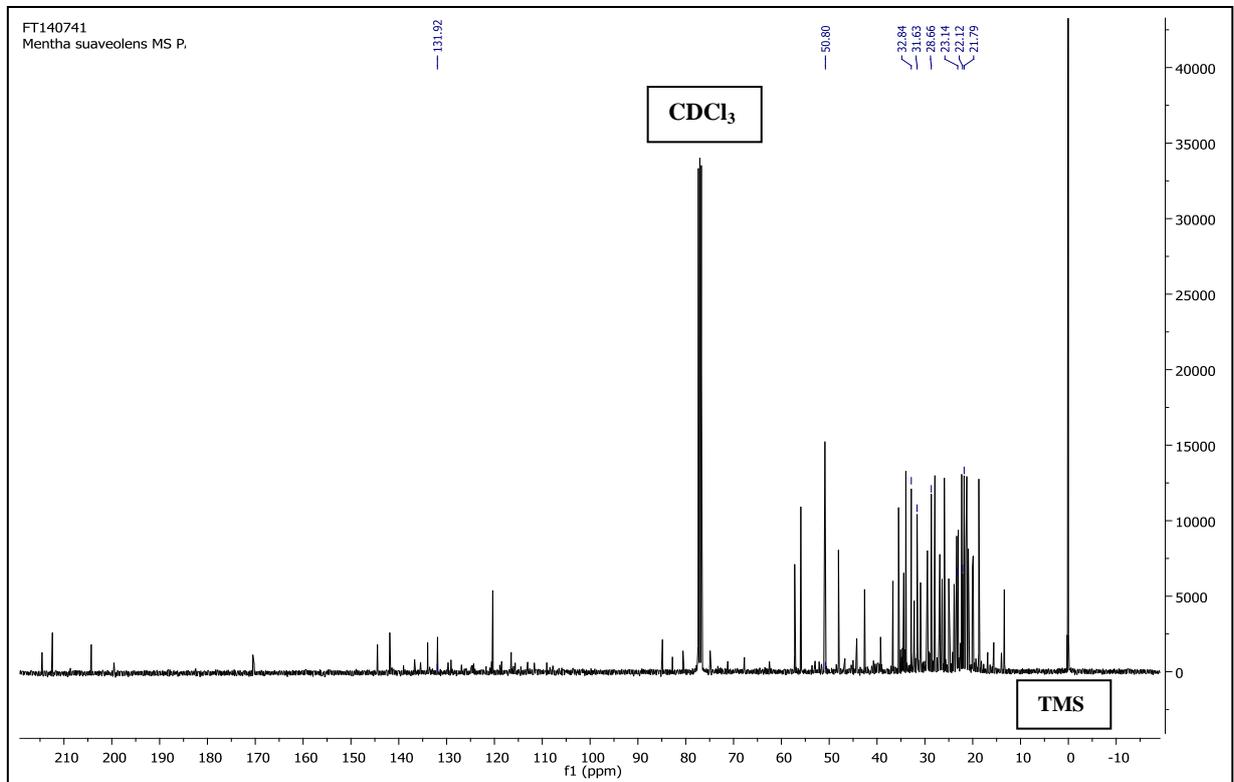
Spectre de RMN du carbone-13 des parties aériennes de *Nepeta nepetella*Spectre de RMN du carbone-13 des feuilles de *Nepeta nepetella*



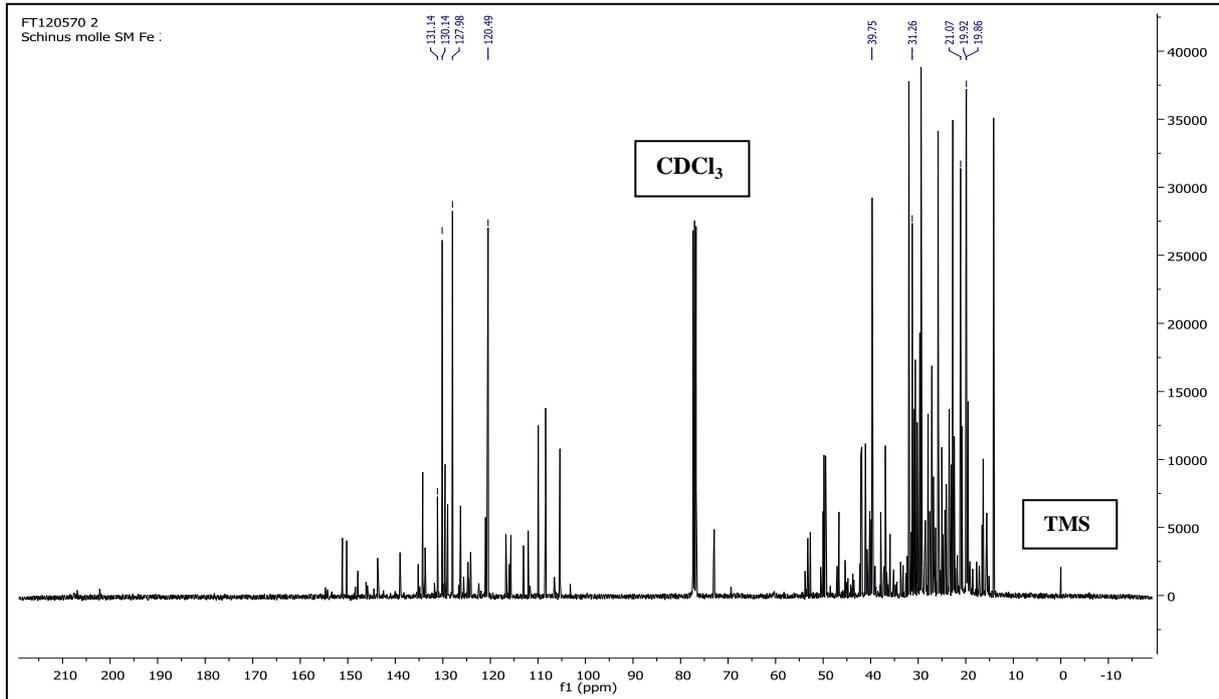
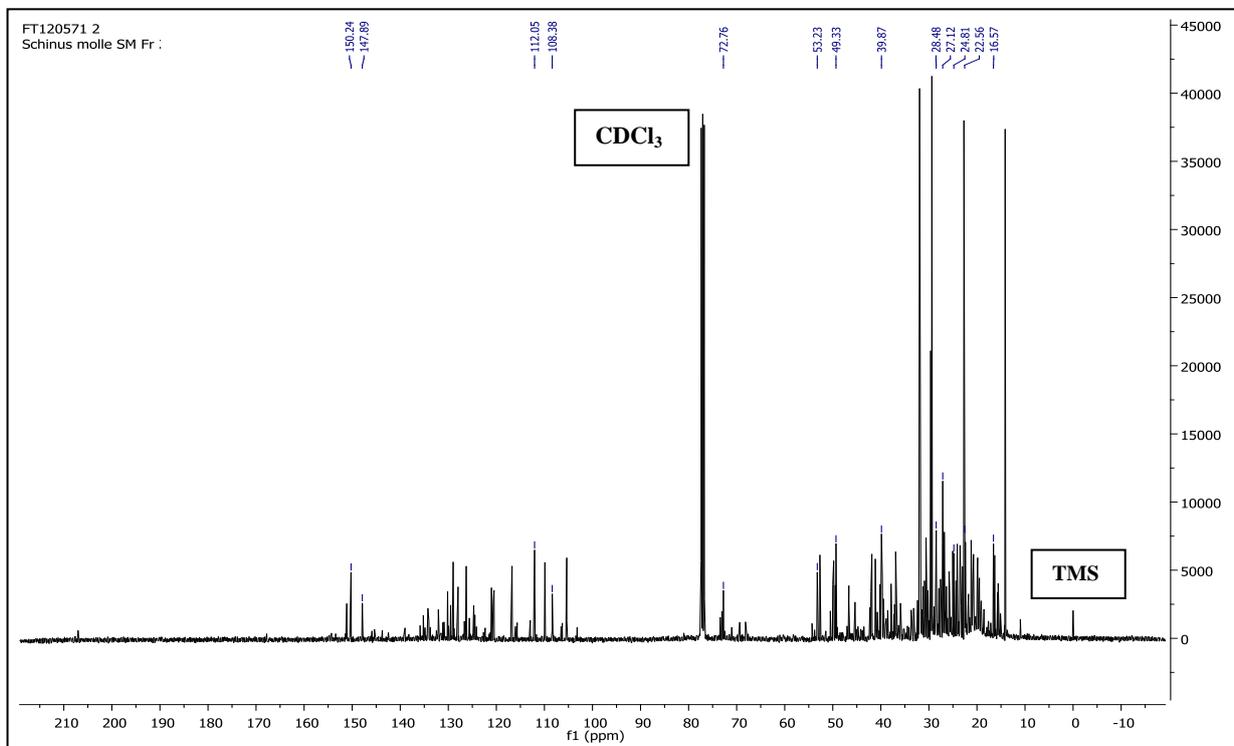
Spectre de RMN du carbone-13 des fleurs de *Nepeta nepetella*



Spectre de RMN du carbone-13 des parties aériennes de *Mentha rotundifolia*
(Déplacements chimiques de la menthone)



Spectre de RMN du carbone-13 des parties aériennes de *Mentha rotundifolia*
(Déplacements chimiques de la pulégone)

Spectre de RMN du carbone-13 des feuilles de *Schinus molle*Spectre de RMN du carbone-13 des fruits de *Schinus molle*

Travaux personnels

Publications :

Seladji M., Belmekki N., Bekhechi C., Bendimerad N. ; (2014).

Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria.

Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., **26(1)** : 228-234.

Seladji M., Bekhechi C., Beddou F., Dib H, Bendimerad N. ; (2014).

Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria

Journal of Applied Pharmaceutical Science, **4 (02)** : 012-016.

Autres contributions :

Dib H., Beghdad M. C., Belarbi M., Seladji M., Ghalem M. ; (2013).

Antioxidant activity of phenolic compounds of the cladodes of *Opuntia Ficus-Indica* Mill. From North West Algeria.

International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences, **3 (4)** : 147-158.

Dib H., Belarbi M., Beghdad M.C., Seladji M. ; (2014).

Antioxidant activity of *Opuntia Ficus-Indica* flowers phenolic extracts.

Int. J. Pharm. Sci. Res., **5(10)** : 4574-4582.

Communications:

SELADJI M, DIB H, BEKHECHI C, BENABADJI N, BENAMMAR C, BENDIMERAD N. Activités antioxydantes des extraits méthanoliques de *Moricandia arvensis*. 2^{ème} journée internationale d'agronomie. 15 Avril 2015-Tlemcen-Algérie.

SELADJI M, DIB H, BELBACHIR K, BEKHECHI C, BENDIMERAD N. Etude phytochimique et activité antioxydante de *Mentha rotundifolia* L. de la région de Tlemcen (ALGERIE). 2^{ème} Congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (BVRB) 18-20 Mars 2014-Tabarka-Tunisie.

SELADJI M, BEDDOU F, DIB H, BELMEKKI N, ABID L, BEKHECHI C, BENDIMERAD N. Etude phytochimique, pouvoir antioxydant et antibactérien de l'extrait méthanolique des feuilles et des fruits de *Schinus molle*. 3^{ème} Congrès International sur les Molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au Stress oxydant. 21-23 Mars 2014-Hammamet-Tunisie.

SELADJI M, DIB H, AMMOURI A, ANNITER A, BENDIMERAD N. Chemical analysis of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*). The Second International Symposium on "Analytical Chemistry for a Sustainable Development"- ACS D 2013- May 7- 9, 2013 Marrakech – Morocco.

Research Article



Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria

Meryem Seladji*, Nacéra Belmekki, Chahrazed Bekhechi, Nassima Bendimerad

Université de Tlemcen, Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Faculté des SNV-STU, Département de Biologie, Nouveau pôle la Rocade 2 Mansourah, BP119, Tlemcen 13000, Algérie.

*Corresponding author's E-mail: mery_seladji@yahoo.fr

Accepted on: 06-03-2014; Finalized on: 30-04-2014.

ABSTRACT

Plants are an essential and integral part of complementary and alternative medicine due to their ability to generate secondary metabolites that are used to restore health and treat many diseases. The aim of the present study was to determine the antioxidant and antimicrobial activities of methanolic and aqueous extract of stems and leaves of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria. The amounts of total phenolics solvent extracts (methanol and water extract) for the two parts of plant were determined spectrometrically. From the analyses, leaves aqueous extract had the highest total phenolic content (20.75 ± 0.643 mg GAE/g). The highest total flavonoids content was measured in methanolic leaves extract (1.97 ± 0.035 mg CAE/g). However the methanolic leaves extract had the highest DPPH scavenging ability with the lowest IC_{50} value (0.7 ± 0.028 mg/ml), the same tendency was observed with ferric reducing power. Concerning β -carotene bleaching assays results showed that the stems aqueous extract exhibited the highest antioxidant ability with an IC_{50} near than standards (0.52 ± 0.024 mg/ml). The antimicrobial activity was studied; all extracts were tested against five bacteria and three fungal species.

Keywords: Aqueous extract, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, *Mentha rotundifolia* L., Methanolic extract.

INTRODUCTION

The medicinal plants have been main source for drugs over many centuries in many countries, in both developed and developing world. Traditional medicines products are not officially recognized in many countries, and the European Union presently developing regulatory laws for quality traditional medicines. It is estimated that at least 25% of all modern medicines are derived either directly or indirectly from medicinal plants. Traditional medicines play important role in world health treating millions of people.¹ The medicinal property of herbs is due to the presence of different complex chemical substance as secondary metabolites, which are exclusively accumulated in different parts of the plants.²

Medicinal plants are rich sources of antimicrobial agents. Many infectious diseases have been known to be treated with herbal extracts which are known to have a vast potentiality. The clinical efficacy of many antibiotics is being threatened by the emergence of multidrug-resistant pathogens.³ As an alternate source to the existing antibiotics; there is an urgent need to discover new antimicrobial compounds from various medicinal plants which can be used to treat many infectious diseases.

Several reports indicate that the antioxidant potential of medicinal plants may be related to the concentration of their phenolic compounds which including flavonoids which are important in plant defense mechanisms against invading bacteria and other types of environmental stress.⁴⁻⁷ Flavonoids have long been recognized to possess anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral and anti-proliferative activities.^{4,8} These compounds are of great

value in preventing the onset and / or progression of many human diseases.⁹ The health-promoting effect of antioxidants from plants is thought to arise from their protective effects by counteracting reactive oxygen species.⁶ Antioxidants are compounds that help delay and inhibit lipid oxidation and when added to foods tend to minimize rancidity, retard the formation of toxic oxidation products, help maintain the nutritional quality and increase their shelf life.¹⁰

Lamiaceae species are considered of high importance because of their use in folk medicine, culinary, cosmetics, flavoring and production of essential oils throughout the world. The genus *Mentha* which comprises 20 species distributed all over the world is among the major genera belonging to Lamiaceae family.¹¹ It comprises herbaceous, perennial plants, common in temperate climates in Mediterranean region, Australia and South Africa.¹² Aerial parts from *Mentha* species have been widely used for the treatment of cold, cholera, bronchitis, tuberculosis, sinusitis and for their diuretic, carminative, anti flatulent, expectorant, anti tussive and antioxidant properties.^{11,13}

Antioxidant capacity is widely used as a parameter to characterize nutritional health food or plants and their bioactive components.¹⁴ The *Mentha* species are cited as favorable free radical scavengers as well as primary antioxidants that may react with free radicals and limit ROS attack on biological and food systems.¹⁵ In Algeria the genus is represented by five species namely: *M. rotundifolia*, *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. aquatica* and *M. pulegium*.¹⁶



Mentha rotundifolia L. is a long-lived plant, with a strong apple odor, drawn up stems, small or average (80 cm maximum), always covered with a thick sleeping bag with a ramified rhizome.¹⁷ *Mentha rotundifolia* (L.) Huds. is a hybrid between *M. longifolia* (L.) and *M. suaveolens* Ehrh.,¹⁸ but, some authors considered *M. rotundifolia* (L.) Huds. as a synonym of *M. suaveolens* Ehrh.,¹⁹ which is always used as condiment. It has been applied in the traditional medicine for a wide range of actions: tonic, stomachic, carminative, analgesic, antispasmodic, anti-inflammatory, sedative, hypotensive and insecticidal.²⁰ However many studies have been carried on the chemical composition and biological activities of essential oils of *M. rotundifolia*.^{14,21-23} Until the investigations of *M. rotundifolia* extracts are still limited to an extract on the corrosion of steel.²⁴

To the best of our knowledge, there are no previous reports concerning *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of these plant parts extracts. The purpose of this study was to determine the total phenolic and the total flavonoid contents of methanol and aqueous extract of stems and leaves of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria, to evaluate their antioxidant activities and to study the antimicrobial activities of those extracts on various bacterial and fungal species.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Plant materials were collected in April 2013 at Tlemcen, Algeria. Botanical identification of the plant was conducted by Professor Noury Benabadiji, "Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes", Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen (Algeria). A Voucher specimen of the plant was deposited in the Herbarium of this laboratory. Plant samples were dried in the shade and conserved for future use.

Preparation of extracts

Aqueous extract

10g of powder dissolved in 150 ml of water leaves distilled water were heated to reflux for 2 hours, after cold filtration, the filtrate was then evaporated to dryness under 65°C at reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi Rotavapor R-200). The residues were then dissolved in 3 ml of methanol.²⁵

Methanolic extract

A sample of 2.5 g of powder sheets was macerated in 25 ml of absolute methanol in magnetic stirring for 30 min. The extract then was stored at 4 °C for 24 h, filtered and the solvent evaporated. Dry under reduced pressure at 50°C at pressure using an evaporator rotary (Büchi Rotavapor R- 200). The resulting solutions were evaporated under vacuum at 50°C. The residues were then dissolved in 3 ml of methanol.²⁶

Determination of total phenolic content

The total phenolic in leaves and stems aqueous and methanolic extracts content was determined by spectrometry using "Folin-Ciocalteu" reagent assay.²⁷ A volume of 200 ml of the extract was mixed with 1 ml of Folin- Ciocalteu reagent diluted 10 times with water and 0.8 ml of a 7.5% sodium carbonate solution in a test tube. After stirring and 30 min later, the absorbance was measured at 765 nm by using a Jenway 6405 UV-vis spectrophotometer. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

Determination of total flavonoid

The total flavonoid content in leaves and stems of methanolic and aqueous extracts was determined by a colorimetric assay.²⁸ 500 µL of catechin standard solution with different concentrations or methanolic extracts was mixed with 1500 µL of distilled water in a test tube, followed by addition of 150 µL of a 5% (w/v) NaNO₂ solution, at time t 0. After 5 min, 150 µL of AlCl₃ at 10% (m/v) was added. After 6 minutes of incubation, at room temperature, 500 µL of NaOH (1 M) were added. The mixture was homogenized immediately after the end of the addition. The absorbance of the solution was measured at 510 nm against the blank. Results were expressed as milligram catechin equivalents of dry weight (mg CE/ g DW).

DPPH Free-Radical-Scavenging Assay

The hydrogen atom or electron donation abilities of some pure compounds were measured by the bleaching of a purple colored methanol solution of the stable 2,2-diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH) radical.²⁹ Fifty microliter of various concentrations of the extracts in methanol were added to 1950 ml of a 0.025 g/l methanol solution DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

Where a blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), a sample is the absorbance of the test compound.

Extract concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the graph plotted of inhibition percentage against extract concentrations. The ascorbic acid (AA) methanol solution and tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) methanol solution were used as positive control.

Reducing power assay

Reducing power of all the extracts of *M. rotundifolia* was determined as described by Oyaizu.³⁰ Different concentrations of plant extract solutions were mixed with



phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 2.5ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20min. After incubation, 2.5ml of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was then centrifuged at 3000 rpm for 10min. The upper layer of solution (2.5ml) was mixed with distilled water (2.5ml) and 0.1% ferric chloride (0.5ml). The absorbance of the mixture was measured at 700 nm. A higher absorbance indicates a higher reducing power. The assays were carried out in triplicate and the results are expressed as mean \pm standard deviation. The extract concentration providing absorbance of 0.5 (IC₅₀) was calculated from the graph of absorbance at 700 nm against extract concentration, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX) and tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) were used as standards.

β Carotene bleaching inhibition capacity

Antioxidant activity based on the β -carotene/ linoleic acid method was evaluated by measuring the inhibition of the bleaching of β -carotene by the peroxides generated during the oxidation of linoleic acid.³¹ Two mg of β -carotene were dissolved in 20 ml chloroform, and 4 ml of this solution were added to linoleic acid (40 mg) and Tween 40 (400 mg). Chloroform was evaporated under vacuum at 40 °C and 100 ml of oxygenated water were added. An emulsion was obtained by vigorously shaken, an aliquot (150 ml) of which was distributed in 96 well microtitre plate and methanolic solutions of the test samples (10 ml) were added. Twice replicates were prepared for each extract concentration. The microplate was incubated at 50 °C for 120 min, and the absorbance was measured at 470 nm using a EAR 400 microtitre reader (Multiskan MS, Labsystems). Readings were performed both immediately (t 0 min) and after 120 min of incubation. The antioxidant activity of the extracts was evaluated in terms of bleaching inhibition of the β carotene using the following formula:

$$\beta \text{ carotene bleaching inhibition (\%)} = [(S - A_{120}) / (A_0 - A_{120}) \times 100]$$

Where A₀ and A₁₂₀ are the absorbances of the control at 0 and 120 min, respectively, and S the sample absorbance at 120 min. The results were expressed as IC₅₀ value (mg/ml).

Antimicrobial activity

Microbial strains

The extracts were individually tested against a panel of 8 microorganisms including six bacteria species, two Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 10876), three Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), yeast (*Candida albicans* ATCC 10231) and two filamentous fungi (*Aspergillus flavus* MNHN 994294 and *Aspergillus fumigatus* MNHN 566).

Inhibition zone determination by disc diffusion assay

Antimicrobial activity of extracts was screened for their inhibitory zone by the agar disc-diffusion method. The inoculums for the assays were prepared by diluting cell mass in 0.9% NaCl solution, adjusted to 0.5 McFarland scale, confirmed by spectrophotometrical reading on Specord 200 Analytikjena (Germany) at 625nm ($\lambda = 0.08 - 0.1$, corresponding to 10⁸ CFU/ml) for bacteria and 530nm ($\lambda = 0.12 - 0.15$, corresponding to 1-5 x 10⁶ CFU/ml) for yeasts. For filamentous fungi, spore suspensions were prepared from 1 week old cultures on PDA plates at 25°C and standardized by adjusting the transmittance to 68 to 82% at 530nm.³² One milliliter of standardized suspension of the tested microorganisms (10⁶ CFU/ml for yeasts and bacteria except, *S. aureus* at 10⁷ CFU/ml and filamentous fungi at 10⁴ spores/ml) was spread on the solid media plates, using Mueller–Hinton agar (Sigma, India) for Bacteria, Sabouraud Dextrose Agar (Sigma, India) for yeasts and PDA (Sigma, Spain) for filamentous fungi. They were “flood-inoculated” onto the surface of the solid media plates. After drying, a sterile paper discs (6mm in diameter) impregnated with 10 μ l of the plant extracts dissolved in pure dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 30 mg/ml (300 μ g/disc) were applied in the Petri dish. A disc prepared in the same condition with only the corresponding volume of DMSO (Sigma, France) was used as a negative control. The activity was determined by measuring the inhibitory zone diameter in mm after incubation at 37°C/24h for bacteria, at 30°C/48h for yeasts and at 25°C/72h for filamentous fungi. Nystatin (30 μ g/disc) was used as reference antifungal against yeasts and filamentous fungi and Cephalexin (30 μ g/disc), Amoxicillin (25 μ g/disc) and Vancomycin (30 μ g/disc) were used as positive controls against bacteria. The data used was the mean of two replicates.

Statistical analysis

All experiments were performed at least in triplicate and the results are presented as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic and total flavonoid content

The total phenol and total flavonoid contents of extracts are shown in Table 1. The results obtained for our extracts show that the total phenolics ranged from 3.96 \pm 0.35 mg GAE/g to 20.75 \pm 0.64 mg GAE/g (Table 1). The extracts having extracted the highest total phenolics are: aqueous extract leaves (20.75 \pm 0.64 mg GAE/g) and methanolic extract leaves (13.46 \pm 0.97 mg GAE/g). The lowest contents of total phenolics were obtained with the methanolic extract stems (3.96 \pm 0.35 mg GAE/g), followed by aqueous extract stems (10.40 \pm 0.61 mg GAE/g). For the total flavonoid the leaves extracts were higher than stems content with 2.19 \pm 0.08 mg CAE/g for methanolic extract and 1.97 \pm 0.03 mg CAE/g for aqueous extract.



However the flavonoid content of stems methanolic and aqueous extracts were 1.6 ± 0.01 mg CAE/g and 0.59 ± 0.03 mg CAE/g respectively. As can be seen, high phenol content was not always accompanied by high flavonoid content concentration, but the percentage contribution

of flavonoid to total phenol varied between aqueous leaves extracts (9.4 %) and the others which are similar for aqueous, methanol stems and leaves methanol extracts.

Table 1: Total phenolic and flavonoid contents of *Mentha rotundifolia* methanolic and aqueous extracts of leaves and stems

Parameter	Leaves		Stems	
	Aqueous	Methanol	Aqueous	Methanol
Phenol content*	20.75 ± 0.64	13.46 ± 0.97	10.40 ± 0.61	3.96 ± 0.35
Total flavonoid **	1.97 ± 0.035	2.19 ± 0.08	1.6 ± 0.01	0.59 ± 0.03
Flavonoid/Phenol (%)	9.4	16	15	14.8

*Expressed as mg GAE/g of dry plant material; ** Expressed as mg CE/g of dry plant material; The data are displayed with mean \pm standard deviation of twice replications; Mean values followed by different superscript in a column are significantly different ($p < 0.05$).

Antioxidant activity

In the present study, three commonly used antioxidant evaluation methods such as DPPH radical scavenging activity, reducing power assay and β -Carotene bleaching inhibition capacity were chosen to determine the antioxidant potential of the methanolic and aqueous extracts of leaves and stems of *Mentha rotundifolia*. All the extracts tested showed an antioxidant activity.

DPPH Free-Radical-Scavenging Assay

The identification of antioxidants from medicinal plants is a fast-growing field of research, and many antioxidants have been investigated by several methods. The DPPH assay is a quick, reliable, and low-cost method that has frequently been used to evaluate the antioxidative potential of various natural compounds.³³

IC₅₀ value was determined from plotted graph of scavenging activity against the different concentrations of *M. rotundifolia* extracts, ascorbic acid, and BHA. The scavenging activity was expressed by the percentage of DPPH reduction after 30 min of reaction. The measurements were duplicate and their scavenging effects were calculated based on the percentage of DPPH scavenged.^{34,35}

The obtained results are summarized in table 2 and the methanolic extract leaves (0.7 ± 0.03 mg/ml) exhibited scavenging activity against DPPH radicals in vitro of all studied extracts of *M. rotundifolia*. For methanolic extract stems (1.38 ± 0.02 mg/ml), aqueous extract leaves (1.01 ± 0.01 mg/ml) and aqueous extract stems (1.07 ± 0.01 mg/ml). These capacities of all extracts were less than the synthetic antioxidant ascorbic acid (0.12 ± 0.08 mg/ml) and BHA (0.09 ± 0.03 mg/ml), also determined in parallel experiments.

Reducing antioxidant power assay (FRAP)

The antioxidant capacity of leaf extracts was evaluated by FRAP assay because it also showed high reproducibility.³⁶ Reducing power is to measure the reductive ability of antioxidant and it is evaluated by the transformation of

Fe^{3+} to Fe^{2+} by donating an electron, Therefore, the Fe^{2+} can be monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm. However, the activity of antioxidants has been assigned to various mechanisms such as prevention of chain initiation, binding of transition-metal ion catalysts, decomposition of peroxides, and prevention of continued hydrogen abstraction, reductive capacity and radical scavenging.^{37,38}

Reducing power of methanolic and aqueous extracts of *Mentha rotundifolia* and standards (BHA and TROLOX) using the potassium ferricyanide reduction method were described in Figure 1.

Table 2: IC₅₀ (mg/ml) values of different methanolic and aqueous extracts of *M. rotundifolia*.

Extracts	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)
Methanol leaves	0.7 ± 0.03
Aqueous leaves	1.01 ± 0.01
Methanol stems	1.38 ± 0.02
Aqueous stems	1.07 ± 0.01
Ascorbic acid	0.12 ± 0.08
BHA	0.09 ± 0.03

The data are displayed with mean \pm standard deviation of twice replications; Mean values followed by different superscript in a column are significantly different ($p < 0.05$).

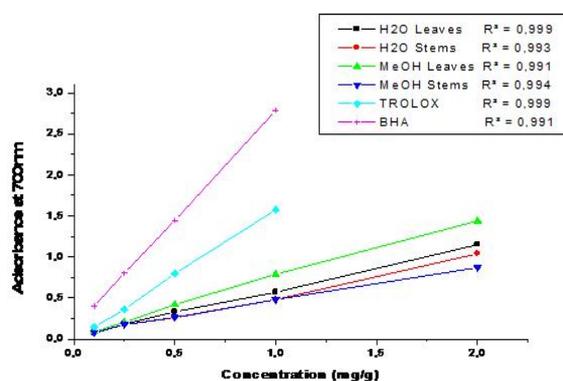


Figure 1: Total reducing power of methanolic and aqueous extracts of *M. rotundifolia*.

Methanolic leaves extracts of *M. rotundifolia* showed strong ferrous iron chelating activity in a dose dependent manner with an IC₅₀ value of 0.6 mg/ml. However, methanol stems extract displayed little reducing power under the experimental concentrations.

β-Carotene-linoleic acid assay

In this model system, β-Carotene undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant, which results in a reduction in absorbance of the test solution with reaction time. This is due to the oxidation of linoleic acid that generates free radicals that attacks the highly unsaturated β-Carotene molecules in an effort to reacquire a hydrogen atom. When this reaction occurs the β-carotene molecule loses its conjugation and, as a consequence, the characteristic orange color disappears. The presence of antioxidant avoids the destruction of the β-carotene conjugate system and the orange color is maintained. The obtained results are summarized in table 3.

Table 3: IC₅₀ (mg/ml) values of β-carotene-linoleic acid assay of methanolic and aqueous extracts of *M. rotundifolia*.

Extracts	β-carotene IC ₅₀ (mg/ml)
Methanol leaves	1.72± 0.03
Aqueous leaves	0.97 ±0.03
Methanol stems	0.62 ± 0.02
Aqueous stems	0.52± 0.02
Gallic acid	0.435 ± 0.003
Trolox	0.242 ± 0.003

The data are displayed with mean ± standard deviation of twice replications; Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

Oxidation of the linoleic acid was effectively inhibited by the parts extracts of *M. rotundifolia*.

Table 4: Antimicrobial activity of different extracts of *M. rotundifolia* using disc diffusion method (inhibition zones, mm)

Microorganism	Leaves		Stems		Controls				Negative Control
	Extracts				Positive Controls				
	Aqueous	Methanol	Aqueous	Methanol	AMX	VA	CN	NY	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5±0.7	9.5±0.7	6.3±0.4	6.1±0.2	26.0±0.0	16.0±0	28.0±0.0	nt	na
<i>Bacillus cereus</i>	na	07.0±0.0	6.11±0.17	na	25.0±0.0	15±0.4	na	nt	na
<i>Escherichia coli</i>	9.9±0.1	10.4±0.8	6.12±0.2	7.5±0.7	12.0±0.2	8.0±0.0	18.0±0.1	nt	na
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.1±0.1	9.0±0.0	na	6.5±0.7	na	na	na	nt	na
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	na	6.1±0.2	6.12±0.2	7.0±0.0	na	na	10.0±0.7	nt	na
<i>Candida albicans</i>	8.2±0.3	10.0±0.0	na	6.5±0.7	na	nt	nt	19.0±0.8	na
<i>Aspergillus flavus</i>	na	na	na	na	na	nt	nt	22.0±0.2	na
<i>Aspergillus fumigatus</i>	na	na	na	na	na	nt	nt	34.0±0.7	na

Nystatin (Ny. 30µg/disc), Cephalixin (CN. 30µg/disc), Amoxicillin (AMX. 25µg/disc) and Vancomycin (VA. 30µg/disc); Mean values of the growth inhibition zones, in mm, including the disc diameter of 6 mm; Antimicrobial activity = Average zone of inhibition ± SD Na, no antimicrobial activity; Nt, not tested

The results show that methanolic extract stems (0.62 ± 0.02 mg/ml), aqueous extract stems (0.52± 0.02 mg/ml), were the most potent of all studied extracts of *M. rotundifolia* and are most similar to Gallic acid (0.43±0.003 mg/ml). Aqueous extract leaves (0.97 ±0.03 mg/ml) and methanol extract leaves (1.72± 0.03 mg/ml) are lower than the activity of standards.

Antimicrobial activity

Plants are important source of potentially useful structures for the development of new chemotherapeutic agents. The first step towards this goal is the in vitro antimicrobial activity assay.³⁹ The antimicrobial potential of both the experimental plant was evaluated according

to their zone of inhibition against various microorganisms and the results (Zone of inhibition) were compared with the activity of the controls (Table 4).

The antimicrobial activity of *M. rotundifolia* extracts was determined against five bacteria, one yeast and two filamentous fungi and their potency was qualitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones, zone diameters. Diameters of inhibition zone less than 7 mm were recorded as non-active, between 7 and 10 mm were recorded as weakly active, more than 10 mm and less than 15 mm were recorded as moderately active and significantly active when diameters of growth inhibition were more than 16 mm.⁴⁰



There is no previous report on evaluation of this plant extracts against these set of microorganisms. The results showed a little or no antimicrobial activity against all strains tested, with inhibition zones between 6.1 and 10.4 mm. However, the methanol and aqueous extracts of *M. rotundifolia* leaves were found to be most effective against *E. coli* and *C. albicans*. In contrast, the most resistant microbial strains were the filamentous fungi. Otherwise, these results showed low antimicrobial activity in comparison with the diameter inhibition of positive controls.

CONCLUSION

In this work, the phenol and flavonoid contents of Algerian *M. rotundifolia* leaves and stems extracts and their related antioxidant activity with three different *in vitro* testing systems, and antimicrobial activity are demonstrated for the first time. Among various extracts tested, the methanolic leaves extract showed the best antioxidant activity. Further, although its antioxidant activity may be due to the presence of high flavonoid content. Although antimicrobial activity of the mentioned extracts were lower than standard reference, this need to be fully clarified by further assay methods. Further studies are also warranted to isolate and characterize active ingredients of this plant extracts that are responsible for the antioxidant activity, and to explore the existence of synergism, if any, among the compounds.

REFERENCES

- Robinson MM, Zhang X, The World Medicines Situation 2011 Medicines: Global Situation, Issues and Challenges WHO, Geneva, 2011, WHO/EMP/MIE/2.3.
- Koochak H, Seyyednejad SM, Motamedi H, Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran), Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3(3), 2010, 180-184.
- Balandrin MF, Kjocke AJ, Wurtele E, Natural plant chemicals: sources of industrial and mechanical materials, Science, 228, 1985, 1154-1160.
- Ndhala AR, Kasiyamhuru A, Mupure C, Chitindingu K, Benhura MA, Muchuweti M, Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *sclerocarya birrea*, Food Chemistry, 103, 2007, 82-87.
- Wallace G, Fry SC, Phenolic components of the plant cell wall, International Review of Cytology, 151, 1994, 229-267.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna, Stocker P, Vidal N, Antioxidant of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, Food Chemistry 97, 2006, 654-660.
- Wong C, Li H, Cheng K, Feng CA, Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay, Food Chemistry, 97, 2006, 705-711.
- Sharma S, Stutzman J, Kellof G, Steele V, Screening of potential chemo-preventive agents using biochemical markers of carcinogenesis, Cancer Research, 54, 1994, 5848-5855.
- Kim D, Ock K, Young J, Hae-Yeon M, Chang YL, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, Journal Agricultural and Food Chemistry, 51, 2003, 6509-6515.
- Fukumoto LR, Mazza G, Assessing antioxidant and prooxidant activities and phenolic Compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 2000, 3597-604.
- McKay DL, Blumberg JB, A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.), Phytotherapy Research, 20, 2006, 519-530.
- Lange B, Croteau R, Genetic engineering of essential oil production in mint. Curr. Opin. Plant Biology, 2, 1999, 139-144.
- Kamkar A, Jebelli Javan A, Asadi F, Kamalinejad M, The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil, Food and Chemical Toxicology, 48, 2010, 1796-1800.
- Riahi L, Elferchichi M, Ghazghazi H, Jebali J, Ziadi S, Aouadhi C, Chograni H, Zaouali Y, Zoghalmi N, Mliki A, Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia, Industrial Crops and Products, 49, 2013, 883- 889.
- Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M, Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species, Iran Journal of Pharm Research, 7 (3), 2008, 203-209.
- Quézel P, Santa S, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed CNRS, Tome II, Paris, 1963.
- Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M, Trotin F, Plantes Médicinales des Régions Tempérées, Ed Maloine, Paris, 1990, 294-295.
- Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Canigual S, Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay, Brazilian Archives of Biology and Technology, 45, 2002, 519-524.
- Hendriks H, Van Os FHL, Essential oils of two chemotypes of *Mentha suaveolens* during ontogenesis, Phytochemistry, 15, 1976, 1127-1130.
- Moreno L, Bello R, Primo-Yufera E, Esplugues J, Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh, Phytotherapy Research, 16, 2002, 10-13.
- Sutour S, Bradesi P, De Rocca-Serra D, Casanova J, Tomi F, Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp. *Insularis* (Req.) Greuter Flavour Fragrance Journal, 23, 2008, 107-114.
- Sutour S, Bradesi P, Casanova J, Tomi F, Composition and chemical variability of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* and *M. suaveolens* ssp. *Insularis* from Corsica, Chemistry and Biodiversity, 7, 2010, 1002-1008.
- Ladjel S, Gherraf N, Hamada D, Antimicrobial effect of essential oils from the Algerian medicinal plant *Mentha rotundifolia* L., Journal of Applied Sciences Research, 7(11), 2011, 1665-1667.
- Khadraoui A, Khelifa A, Hamitouche H, Mehdaoui R, Inhibitive effect by extract of *Mentha rotundifolia* leaves on the corrosion of steel in 1 M HCl solution, Research on Chemical Intermediates, 40, 2014, 961-972.



25. Majhenic L, Kerget MS, Knez Z, Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts, *Food Chemistry*, 104, 2007, 1258-1268.
26. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdely C, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *Compte Rendu de Biologie*, 331, 2008, 372-379.
27. Singleton CP, Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 1965, 144.
28. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64(4), 1999, 555-559.
29. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 1998, 270-276.
30. Oyaizu M, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 1986, 307-315.
31. Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linssen, AG, Lyuba NE, Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochemical Analyses*, 13 (1), 2002, 8-17.
32. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å, Bolmström A, Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1998, 2586-2589.
33. Molyneux P, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 2004, 211-219.
34. Blois MS, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 29, 1958, 1199-1200.
35. Singh R, Singh N, Saini BS, Rao HS, In vitro antioxidant activity of pet ether extracts of black pepper, *Indian Journal of Pharmacology*, 40, 2008, 147-151.
36. Thaipong K, Boonprakoba U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins BD, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 2006, 669-675.
37. Diplock AT, Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease, *Free Radical Research*, 27, 1997, 511-532.
38. Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilaloglu V, Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf. Ex. D.C.) Sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, 5030-5034.
39. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AJ, Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 61 (1), 1998, 57-65.
40. Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP, Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance, *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 2012, 265-273.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.



Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria

Meryem SELADJI *, Chahrazed BEKHECHI, Fawzia BEDDOU, Hanane DIB, Nassima BENDIMERAD

Laboratory of Natural Products (LAPRONA), Department of Biology, University of Tlemcen-Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 29/12/2013

Revised on: 10/01/2014

Accepted on: 07/02/2014

Available online: 27/02/2014

Key words:

Nepeta nepetella, methanolic extract, aqueous extract, phytochemical screening, antioxidant activity, DPPH assay, reducing power activity, β -carotene bleaching assay.

ABSTRACT

Plant phenolics constitute one of the major groups of components that act as primary antioxidant free radical terminators. This paper reports the antioxidative activity of methanolic and water extract of *Nepeta nepetella*. Phytochemical screening of the crude extracts of stems, leaves and flowers revealed the presence of different kind of chemical groups such as flavonoids, tannins, alkaloids, saponins and carbohydrates. The amounts of total phenolics solvent extracts (methanol and water extract) for the three parts of plant were determined spectrometrically. From the analyses, leaves methanolic extract had the highest total phenolic content (58.11 ± 1.24 mg GAE/g), the highest DPPH scavenging ability with the lowest IC₅₀ value (1.45 ± 0.07 mg/ml), the same tendency was observed with ferric reducing power. Concerning β -carotene bleaching assays results showed that the stems methanolic extract exhibited the highest antioxidant ability with an IC₅₀ higher than standards (0.148 ± 0.003 mg/ml).

INTRODUCTION

Native plants have been reported to have antimicrobial and antioxidant properties for centuries and indigenous plants have been used in herbal medicine to cure various diseases (Tepe *et al.*, 2005). Many kinds of diseases have been treated with herbal remedies since ancient times. Herbal remedies are still being used extensively in many countries. Therefore, research on biologically active extracts and compounds from natural sources has been of great interest to scientists in an attempt to discover new sources for drugs that may be useful in combating infectious diseases. Many authors reported that it was necessary to establish a rational relationship between chemical, biological and therapeutic activities in traditional medicine (Khlebnikov *et al.*, 2007) and (Fura, 2006). In recent years, there has been a resurgence of interest in evaluating plants possessing antibacterial activities for various diseases (Roselli *et al.*, 2007). A number of studies dealing with antimicrobial screening of extracts medicinal plants have been conducted (Rangasamy *et al.*, 2007). Current research on free radicals confirms the essential role played by rich foods in antioxidants in the prevention of cardiovascular diseases

and cancers (Valko *et al.*, 2007) and (Ljubuncic *et al.*, 2005). This is due to the presence of secondary metabolites which accumulate in the various parts of these plants conferring on them their pharmacological relevance (Babalola *et al.*, 2001). Generally, some of these plants especially the edible ones are eaten habitually without knowledge of their pharmacological effect. Among secondary metabolites, the polyphenol compounds play a wide range of biological effects including antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective, antithrombotic, antiviral, anticarcinogenic and cardioprotective and vasodilatory effects (Trigui *et al.*, 2013). A direct relationship has been found between the phenolic content and antioxidant capacity of plants (Al-Mamary *et al.*, 2002; Cowan, 1999; Robards *et al.*, 1999; Wollgast and Anklam, 2000; Vaya *et al.*, 1997). The genus *Nepeta* (Lamiaceae) comprises about 400 species, most of which grow wild in Central and Southern Europe, the North Africa and Central and Southern Asia. A lot of species of this genus are used in folk medicine for the antiseptic and astringent properties as topical remedy in children cutaneous eruptions, snakes and scorpion bites; orally, they are utilized as anti-tussive, anti-spasmodic, anti-asthmatic, febrifuge and diuretic (Lewis, 1977; Perry, 1980; Moerman, 1982; Duke and Ayensu, 1985; Bezanger-Beauquesne

* Corresponding Author

Mail : mery_seladji@yahoo.fr

et al., 1990; Bourrel *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 1987). Moreover, anti-bacterial, fungicidal and anti-viral activities have been attributed to nepetalactones, iridoids contained in several *Nepeta* species (Bourrel *et al.*, 1993; Sattar *et al.*, 1995).

The aim of the present investigation was to study one of genus of *Nepeta* who is *Nepeta nepetella* it's an endemic plant to the region of Ain Sefra, Algeria. We want to determine antioxidant capacities, phytochemical constituents, and total phenolic contents of methanolic and aqueous extracts of her leaves, flowers, and stems.

MATERIEL AND METHODS

Plant material

The aerial part (leaves, flowers and stems) of *N.nepetella* was harvested in May 2012 from Ain Sefra, Algeria. The plants collected were identified by the Vegetable Ecological Laboratory and Professor BENABADJI Noury. Plant samples were dried in the shade and conserved for future use.

Preparation of extracts

Aqueous extract

10g of powder dissolved in 150 ml of water leaves distilled water were heated to reflux for 2 hours, after cold filtration, the filtrate was then evaporated to dryness under 65 ° C at reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi Rotavapor R-200). The residues were then dissolved in 3 ml of methanol (Majhenic *et al.*, 2007).

Methanolic extract

A sample of 2.5 g of powder sheets was macerated in 25 ml of absolute methanol in magnetic stirring for 30 min. The extract then was stored at 4 °C for 24 h, filtered and the solvent evaporated. Dry under reduced pressure at 50 °C at pressure using an evaporator rotary (Büchi Rotavapor R- 200).The resulting solutions were evaporated under vacuum at 50 °C. The residues were then dissolved in 3 ml of methanol (Falleh *et al.*, 2008).

Phytochemical analysis

Phytochemical analysis of methanol and aqueous extracts of *Nepeta nepetella* leaves, flowers and stems were conducted by standard qualitative analytical methods for identification of diverse phytochemicals such as carbohydrates (Deb, 2001), saponins (Kokate, 1999), phenolics (Mace, 1963; Raaman, 2006) and flavonoids (Harborne, 1983; Shinoda, 1928).

Determination of total phenolic contents

The total phenolic in leaves and stems methanolic extracts content was determined by spectrometry using "Folin-Ciocalteu" reagent assay (Singleton and Rossi., 1965). A volume of 200 ml of the extract was mixed with 1 ml of Folin- Ciocalteu reagent diluted 10 times with water and 0.8 ml of a 7.5% sodium carbonate solution in a test tube. After stirring and 30 min later, the absorbance was measured at 765 nm by using a Jenway 6405

UV-vis spectrophotometer. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

DPPH Free-Radical-Scavenging Assay

The hydrogen atom or electron donation abilities of some pure compounds were measured by the bleaching of a purple colored methanol solution of the stable 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998). Fifty microliter of various concentrations of the extracts in methanol were added to 1950 ml of a 0.025 g/l methanol solution DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

Where a blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), a sample is the absorbance of the test compound.

Extract concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the graph plotted of inhibition percentage against extract concentrations. The ascorbic acid (AA) methanol solution and tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) methanol solution were used as positive control.

Reducing power assay

Reducing power of the extracts was determined as described by Oyaizu (1986). Different concentrations of plant extract solutions were mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 2.5ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20min. After incubation, 2.5ml of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was then centrifuged at 3000 rpm for 10mn. The upper layer of solution (2.5ml) was mixed with distilled water (2.5ml) and 0.1% ferric chloride (0.5ml). The absorbance of the mixture was measured at 700 nm. A higher absorbance indicates a higher reducing power. The assays were carried out in triplicate and the results are expressed as mean ± standard deviation. The extract concentration providing absorbance of 0.5 (IC₅₀) was calculated from the graph of absorbance at 700 nm against extract concentration, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX) and tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) were used as standards.

β-Carotene bleaching inhibition capacity

The capacity of extracts to inhibit the β-carotene bleaching was determined according to Koleva *et al.*, (2002) with minor modifications. Two mg of β-carotene were dissolved in 20 ml chloroform, and 4 ml of this solution were added to linoleic acid (40 mg) and Tween 40 (400 mg). Chloroform was evaporated under vacuum at 40 °C and 100 ml of oxygenated water were added. An emulsion was obtained by vigorously shaken, an aliquot (150 ml) of which was distributed in 96 well microtitre plate and methanolic solutions of the test samples (10 ml) were added.

Twice replicates were prepared for each extract concentration. The microplate was incubated at 50 °C for 120 min, and the absorbance was measured at 470 nm using a EAR 400 microtitre reader (Multiskan MS, Labsystems). Readings were performed both immediately (t 0 min) and after 120 min of incubation. The antioxidant activity of the extracts was evaluated in terms of bleaching inhibition of the β carotene using the following formula: β carotene bleaching inhibition (%) = $[(S - A_{120}) / (A_0 - A_{120}) \times 100]$ Where A_0 and A_{120} are the absorbances of the control at 0 and 120 min, respectively, and S the sample absorbance at 120 min. The results were expressed as IC₅₀ value (mg/ml).

Statistical analysis

All evaluations of antioxidant activity were performed in twice. Data were expressed as means \pm standard deviation (S.D.).

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical analysis

Preliminary phytochemical screening of the aqueous and methanolic extracts of *Nepeta nepetella* leaves, flowers and stems revealed the presence of various bioactive components. It revealed the presence of tanins, carbohydrates, saponins, phenols and flavonoids in the aqueous extract. Alkaloids, carbohydrates, and saponins were absent in the methanol extract. The methanol extract was found to contain phenols and flavonoids as major phyto-components.

Total phenolics content

The total phenols contents of extracts are shown in Table 1. The results obtained in our extracts show that the total phenolics have varied from 13.18 \pm 1.04 to 58.11 \pm 1.24 mg GAE/g (Table 1). The extracts having extracted the highest total phenolics are: methanolic extract flowers (58.11 \pm 1.24 mg GAE/g), methanolic extract stems (41.725 \pm 0.38 mg GAE/g) and aqueous extract leaves (41.65 \pm 2.18 mg GAE/g). The lowest contents of total phenolics were obtained with the methanolic extract flowers (21.42 \pm 0.96 mg GAE/g), followed by aqueous extract stems (14.98 \pm 1.07 mg GAE/g), and finally aqueous extract flowers with (13.18 \pm 1.04 mg GAE/g).

Antioxidant activity

In the present study, three commonly used antioxidant evaluation methods such as DPPH radical scavenging activity, reducing power assay and β -Carotene bleaching inhibition capacity were chosen to determine the antioxidant potential of the methanolic and aqueous extracts of leaves, flowers and stems of *Nepeta nepetella*.

DPPH Free-Radical-Scavenging Assay

Free radical assay is one of the most widely used methods and has become routine in establishing the antioxidant activity of herbal extracts and photochemical. Hydrogen donating ability is an index of primary antioxidants. DPPH is known to abstract labile hydrogen and the ability to scavenge the DPPH radical is related to the inhibition of lipid peroxidation (Matsubara *et al.*, 1991)

IC₅₀ value was determined from plotted graph of scavenging activity against the different concentrations of *N.nepetella* extracts, ascorbic acid, and BHA. The scavenging activity was expressed by the percentage of DPPH reduction after 30 min of reaction. The measurements were duplicate and their scavenging effects were calculated based on the percentage of DPPH scavenged (Blois *et al.*, 1958; Singh *et al.*, 2008). The obtained results are summarized in table 2.

The results show that methanolic extract leaves (1.45 \pm 0.07 mg/ml), methanolic extract flowers (2.75 \pm 0.03 mg/ml), were the most potent of all studied extracts of *N.nepetella*. For methanolic extract stems (7.37 \pm 0.17mg/ml), aqueous extract leaves (10.435 \pm 0.61mmg/ml), aqueous extract flowers (17.7 \pm 0.14 mg/ml) and aqueous extract stems (20.16 \pm 0.23 mg/ml).

These capacities of all extracts were less than that ascorbic acid (0.12 \pm 0.08 mg/ml) and BHA (0.09 \pm 0.03 mg/ml).

Reducing antioxidant power assay (FRAP)

The antioxidant capacity of leaf extracts was evaluated by FRAP assay because it also showed high reproducibility (Thaipong *et al.*, 2006). Reducing power is to measure the reductive ability of antioxidant and it is evaluated by the transformation of Fe³⁺ to Fe²⁺ by donating an electron, Therefore, the Fe²⁺ can be monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm.

However, the activity of antioxidants has been assigned to various mechanisms such as prevention of chain initiation, binding of transition-metal ion catalysts, decomposition of peroxides, and prevention of continued hydrogen abstraction, reductive capacity and radical scavenging (Diplock, 1997; Yildirim *et al.*, 2000).

Reducing power of methanolic and aqueous extracts of *Nepeta nepetella* and standards (BHA and TROLOX) using the potassium ferricyanide reduction method were described in Fig 1. Methanolic extracts of *N.nepetella* were more potent on reducing power compared to aqueous extracts. However, the reduction power of BHA and TROLOX was relatively more pronounced than that of the different extracts *N.nepetella*.

Table 1: Total phenolics contents of *Nepeta nepetella* methanolic and aqueous extracts of leaves, flowers and stems.

Parameter	Leaves		Flowers		Stems	
	Aqueous	Methanol	Aqueous	Methanol	Aqueous	Methanol
Phenols contents*	41.65 \pm 2.18	58.11 \pm 1.24	13.18 \pm 1.04	21.42 \pm 0.96	14.98 \pm 1.07	41.725 \pm 0.38

*Expressed as mg GAE/g of dry plant material.

The data are displayed with mean \pm standard deviation of twice replications.

Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

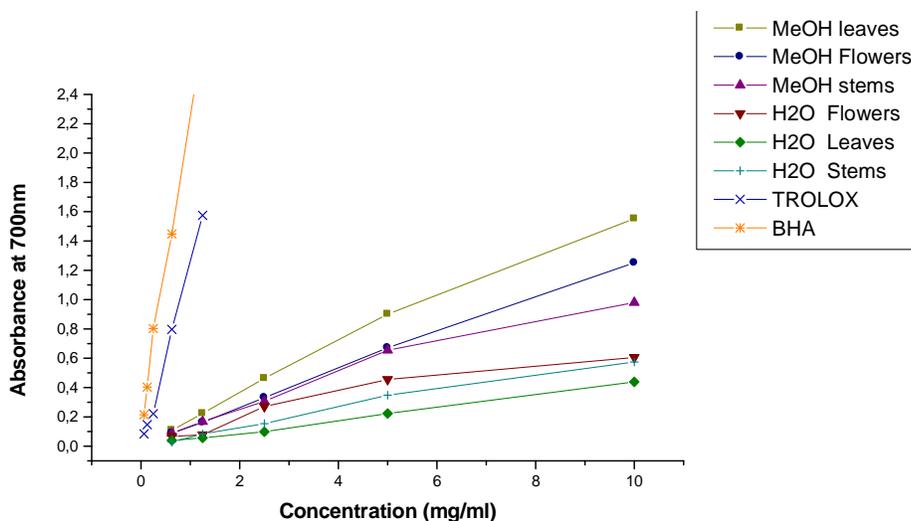


Fig. 1: Total reducing power of methanolic and aqueous extracts of *Nepeta nepetella*.

Table. 2: IC₅₀ (mg/ml) values of different methanolic and aqueous extracts of *N.nepetella*.

Extract	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)
Methanol leaves	1.45 ± 0.07
Aqueous leaves	10.435±0.61
Methanol flowers	2.75±0.03
Aqueous flowers	17.7±0.14
Methanol stems	7.37±0.17
Aqueous stems	20.16±0.23
Ascorbic acid	0.12±0.08
BHA	0.09±0.03

The data are displayed with mean ± standard deviation of twice replications.

Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

Table. 3: IC₅₀ (mg/ml) values of β carotene-linoleic acid assay of methanolic and aqueous extracts of *N.nepetella*.

Extract	β carotene IC ₅₀ (mg/ml)
Methanol leaves	0.247 ± 0.003
Aqueous leaves	8.02 ± 0.15
Methanol flowers	0.195 ± 0.007
Aqueous flowers	24.815 ± 0.26
Methanol stems	0.148 ± 0.003
Aqueous stems	24.815 ± 0.26
Gallic acid	0.435 ± 0.003
Trolox	0.242 ± 0.0028

The data are displayed with mean ± standard deviation of twice replications.

Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

β-Carotene –linoleic acid assay

In this model system, β-Carotene undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant, which results in a reduction in absorbance of the test solution with reaction time. This is due to the oxidation of linoleic acid that generates free radicals that attacks the highly unsaturated β-Carotene molecules in an effort to reacquire a hydrogen atom. When this reaction occurs the β-carotene molecule loses its conjugation and, as a consequence, the characteristic orange color disappears. The presence of antioxidant avoids the destruction of the β -carotene conjugate system and the orange color is maintained. The obtained results are summarized in table 3. The results show that methanolic extract leaves (0.247 ± 0.03 mg/ml), methanolic extract flowers (0.195±0.03 mg/ml), and methanolic extract stems (0.148 ± 0.003 mg/ml) were the most potent of all studied extracts of *N.nepetella* and are similar to high than Gallic acid (0.435±0.003 mg/ml) and Trolox (0.242±0.002 mg/ml).

For aqueous extract leaves (8.02±0.15 mg/ml), aqueous extract flowers (24.815±0.26 mg/ml) and aqueous extract stems (24.815±0.26 mg/ml).

CONCLUSION

On basis of the results obtained in the present study, it was concluded that the methanolic extracts of leaves, stems and flowers of this species possess significant antioxidant activity in comparison with the aqueous extracts, the unequal distribution of phenolics compounds in different extracts may account for this fact. We can say that methanol is a better solvent for the full exploitation of the therapeutic potentials of *N.nepetella* since it exhibited higher antioxidant properties than aqueous extract for all parts of plant. Further studies are needed for the isolation and identification of bioactive compounds responsible for antioxidant activity.

REFERENCES

- Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Res*, 2002; 22:1041-1047.
- Babalola OO, Anetor JI, Adeniyi FAA. Amelioration of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity by terpenoid extract from leaves of *Vernonia amygdalina*. *Afr J Med Sci*, 2001; 30(1-2):91-93.
- Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M, Trotin F. 1990. *Plantes Médicinales des Régions Tempérées*. Maloine, ed. Paris: 294-295.
- Bland JS. Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential. *J Nutr Environ. Med*, 1995; 5:255-280.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958; 29:1199-1200.
- Bourel C, Perineau F, Michel G, Bessiere JM. Catnip (*Nepeta cataria* L.) essential oil: analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. *J Essential Oil Res*, 1993; 5:159.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Rev*, 1999; 12:564-582.
- Diplock AT. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease?. *Free Radic Res*, 1997; 27:511-532.
- Duke JA, Ayensu ES. 1985. *Medicinal Plants of China*. Vol. 2. Reference Publications, Inc. Algonac. Michigan: 376.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouroufi N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*, 2008; 331:372-379.
- Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug Disc Today*, 2006; 11:133.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002; 96:67-202.
- Herman L, De Potter HL, Nicolai B, De Buyck LF, Goetgebeur P, Schamp NM. The essential oil of *Nepeta nuda*. Identification of a new nepetalactone diastereoisomer. *Phytochemistry*, 1987; 26:2311-2314.
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem*, 2001; 73:288-290.
- Khlebnikov, AI, Schepetkin I, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved Quantitative Structure-Activity Relationship Models to Predict Antioxidant Activity of Flavonoids in Chemical, Enzymatic and Cellular Systems. *Bioorg Med Chem*, 2007; 15:1749.
- Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linssen, AG, Lyuba NE. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*, 2002; 13(1):8-17.
- Lewis WH, 1977. *Medical Botany (Plants Affecting Man's Health)*. Wiley-Interscience Publication/John Wiley & Sons, ed. New York:257.
- Ljubuncic P, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine. *J Ethnopharmacol*, 2005; 101:153.
- Majhenic L, Kerget MS, et Knez Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, 2007; 104:1258-1268.
- Matsubara N, Fuchimoto S, Iwagaki H, Nonaka Y, Kimura T, Kashino H, Edamatsu R, Hiramatsu M, Orita K. The possible involvement of free radical scavenging properties in the action of cytokines. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1991; 71:239-242.
- Moerman DE. 1982. *Geraniums for the Iroquois: A Field Guide to American Indian Medicinal Plants*. Reference Publications, Inc. Algonac. Michigan:43-45.
- Mondal SK, Chakraborty G, Guapata M, Mazumder UK. In-vitro antioxidant activity of *Diospyros malabarica* Kostel bark. *Indian Journal of experimental Biol*, 2006; 44:39-44.
- Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986; 44:307-315.
- Perry LM. 1980. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. MIT Press. Cambridge:MA620.
- Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Res*, 1998; 18:1995-2018.
- Rangasamy O, Raelison G, Rakotoniriana FEJ. Screening for anti-effective properties of several medicinal plant of the Mauritius flora. *Ethnopharmacol.*, 2007, 109:331
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999; 66:401-436.
- Roselli M, Britti MS, Le Huërou-Luron I, Marfaing H, Zhu WY, Mengheri E. Effect of different plant extracts and natural substances (PENS) against membrane damage induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in pig intestinal cells. *Toxicol Vitro*, 2007; 21:224-229.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 1998; 76:270-276.
- Sattar A, Bankova V, Kujumgiev A, Galabov A, Ignatova A, Todorova C, Popv S. Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmacie*, 1995; 50:62-65.
- Singh R, Singh N, Saini BS, Rao HS. In vitro antioxidant activity of pet ether extract of black pepper. *Ind J Pharmacol*, 2008; 40:147-151.
- Singleton C.P, Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*, 1965; 16:144.
- Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A short review. *Food Chem Toxicol*, 2002; 40:1091-1097.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* miller (Lamiaceae). *Food Chem*, 2005; 90:333-340.
- Thaipong K, Boonprakoba U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins BD. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 2006; 19:669-675.
- Trigui M, Ben Hsouna A, Tounsi S, Jaoua S. Efficacy of *Lawsonia inermis* leaves extract and its phenolic compounds against olive knot and crown gall diseases. *Ind Crop Prod*, 2013; 45 :83-88.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem Cell Biol*, 2007; 39:44.
- Vaya J, Belinky P.A, and Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997; 23:302-313.
- Wollgast J, and Anklam E. Review on polyphenols in theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 2000; 33:423-447.
- Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia argentea* Desf. Ex. D.C.) Sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. *J Agric Food Chem*. 2000; 48:5030-5034.

How to cite this article:

Meryem SELADJI, Chahrazed BEKHECHI, Fawzia BEDDOU, Hanane DIB, Nassima BENDIMERAD. Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria. *J App Pharm Sci*, 2014; 4 (02): 012-016.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE CLADODES OF *OPUNTIA FICUS-INDICA* MILL. FROM NORTHWEST ALGERIA

HANANE DIB, M. CHOUKRI BEGHAD, MERIEM BELARBI,
MERYEM SELADJI & MERIEM GHALEM

Department of Biology, Faculty of Science, Natural Products Laboratory, Research Team "Physico-Chemical
Plants and its Nutritional Properties", Aboubekbkaid University of Tlemcen, Algeria

ABSTRACT

The young stems of *Opuntia ficus-indica* L., known as cladodes are widely consumed in the world, and appreciated for their high content of fibre and beneficial effects in the metabolism of glucose. The antioxidant activity of total polyphenols, flavonoids and tannins extracts of *Opuntia ficus-indica* grown in Algeria were investigated by using in-vitro antioxidant models including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay, reducing power and total antioxidant capacity. The quantitative estimation showed that cladodes were rich in polyphenols which the predominant part is represented by flavonoids (11.86mgCE /gDW) followed by the tannins (6.45mg/g). Our results demonstrate clearly that all extracts have antioxidant capacity. Among these extracts, the ethyl acetate fraction of flavonoids exhibited strong scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) with IC₅₀ values ranged from (0,6 to 5,3mg/ml), and reducing power than the diethyl ether fraction and n-butanol fraction of flavonoids. *Opuntia ficus-indica* cladodes extracts contain high amounts of polyphenols with strong antiradical, antioxidant capacity and reducing properties which might constitute an important source of natural antioxidants.

KEYWORDS: *Opuntia ficus-indica*, Cladodes, Antioxidant Activities, DPPH, FRAP, Total Antioxidant Capacity

INTRODUCTION

Recently much attention has been focused on the use of plant materials such as fruit, vegetables, spices, leaves, roots and bark as natural antioxidants which can effectively replace synthetic antioxidant (tert-butylhydroxytoluene, tert-butylhydroxyanisole, and tert-butylhydroquinone (Esam et al; 2000). Plants not only add nutritional value to the food but also contribute in the protection from free radical deterioration by retardation of lipid peroxidation. Free radicals promote oxidative damage which plays a role in the pathogenesis of many diseases including cancer, arthritis, atherosclerosis, Alzheimer's diseases, and diabetes (Rimm et al., 1996). The antioxidant activities of plant extracts are usually linked with the presence of anthocyanins, phenolic acids, flavonoids, and tannins. The interest in polyphenolic antioxidants has increased remarkably in the last decade because of their elevated capacity in scavenging free radicals associated with various diseases. This property has been evidenced by a large number of tests (DPPH, FRAP, β -carotène, ABTS) measuring the antioxidant activity in vitro (Huang et al., 2002). *Opuntia ficus indica* (L.) Miller is a member of the cactaceae family, which is widely distributed in several parts of the world such as Mexico, Africa, Australia, the Mediterranean basin, and some parts of Asia (Aserca, 1999). Cactus species is widely utilized in semi-arid zones as a fruit and forage crop. It is one of the few crops that can be cultivated in areas which offer little growth possibility for common fruits and vegetables (Saenz, 2000; Saenz et al; 1998). *Opuntia ficus indica* (L.) Miller species could be distinguished by the flowering time and the period of fruit maturation (Dehbi & Radouane, 2000). In addition, the presence and absence of spines on cladodes is a frequently used character in the ecotype identification. However, the expression of such characters

could be more or less influenced by the environmental conditions. At actual time there is no marker-assisted breeding program for *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. The successful introduction of *Opuntia* in these areas has been attributed to its Crassulacean acid metabolism (CAM). The CAM plants take up CO₂ primarily at night, leading to high water-use efficiency and high drought resistance, which are important features for arid regions with limited rainfall (Nobel, 1988). Most of the research published about chemical composition of cladodes (Ayadi et al; 2009; Guevara-Figueroa et al; 2010; Rodriguez-Felix & Cantwell, 1988) have been performed in the raw material. However, changes in chemical composition of *Opuntia* cladodes have been scarcely studied (Cardenas-Medellin et al; 1998; Guevara-Figueroa et al; 2010; Jaramillo-Flores et al; 2003). Other authors have studied the nutritional significance of *Opuntia* sp. (Stintzing et al; 2001). Crude young cladodes have been studied as a source of fibres (Majdoub et al; 2001) and proteins and amino acids (Teles et al; 1997). Their chemical composition depends on variety, maturation stage and environmental conditions (Rodriguez-Garcia et al; 2007; Bentancourt-Dominguez et al; 2006). Previous studies on the chemical composition of the edible portion of cladodes and fruits from *Opuntia ficus-indica* show that these foods have a high nutritional value, mainly due to their mineral, protein, dietary fiber and phytochemical contents (Rodriguez-Garcia et al; 2007; Hernandez-Pérez et al; 2005; Ayadi et al; 2009; Rodríguez-Felix et al; 1988). Cladodes have been investigated as a possible treatment for gastritis, hyperglycemia, atherosclerosis, diabetes, and prostatic hypertrophy (Hegwood, 1990; Frati et al; 1990; Palevitch et al; 1993). The components obtained from the cladodes contain a large amount of active ingredients, particularly antioxidant constituents including Vitamin C, Vitamin E, carotenoids, glutathione, flavonoids and phenolic acids etc (Panico et al; 2005). Interestingly, antioxidant activity has also been reported (Kuti, 2004; Cornal-Aguayo et al; 2008). Besides being a traditional source of vegetables, cladodes also have medical and animal breeding applications (Ayadi et al; 2009; Galati et al; 2007).

As a continuation of our studies on the Algerian *Opuntia ficus indica*, we report here the nutritional potential by their chemical composition and the antiradical activity of its cladodes. The study seeks to contribute to the knowledge of the chemical composition and bioactivity of this species and also of its potential use as a functional food. To the best of our knowledge, there are no such reports concerning Algerian cultivar, so the present work has focused to study the nutritional value of cladodes of *Opuntia ficus indica* growing in northwest of Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Opuntia ficus-indica lopping cladodes (modified stems in cacti) were harvested in spring season of 2012 in the region of AIN YOUCEF northwest of Algeria. In laboratory, cladodes were washed, dried at ambient temperature, cut into approximately 1cm squares and finely ground, then stored in glass vials protected from light at -20°C which were used for extractions. All analyses were performed at least in duplicate. Plants were identified at the laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems of University of Tlemcen (Algeria).

PREPARATION OF EXTRACTS

Polyphenols Extraction

The dried cladodes (10 g) were ground and extracted with acetone – water (70/30, v/v) by maceration at room temperature for 24 hours (Yu & Dahlgren et al; 2005). Then the extracts were filtered through whatman filter paper under vacuum. The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure at 45°C and was stored at 4°C, for further investigation.

Flavonoids Extraction

10g of dried material were extracted with 100 ml of methanol (MeOH) and 5g of carbonat of Calcium by boiling for 1 hour (Dauguet & Foucher, 1982). After filtration through whatman filter paper, the MeOH was evaporated under reduced pressure and affording the aqueous extracts. Subsequently, recover the dry extract with 50 ml of boiling water. The aqueous extracts was filtered and then fractionated by solvent – solvent extraction, first with Diethyl Ether, Ethyl acetate and then with n-butanol, using a separating funnel (Pyrex). All the fractions were concentrated, dried to constant weight in a vacuum oven at 45°C and kept at 4°C.

Tannins Extraction

Powdered material (5 g) was extracted at 4 °C using 200 ml of a mixture of acetone – water (25/45, v/v) for 4 days (Bruneton, 1999)

The extracts were filtered under vacuum through filter paper and acetone was evaporated under reduced pressure. Subsequently, the dichloromethane (2 x 25 ml) was used for the extraction of lipids and pigments from the aqueous extracts using a separating funnel. Afterward, the aqueous phase was extracted with 25 ml of ethyl acetate. This process was repeated 4 times. After filtration, the organic phases (ethyl acetate) containing tannins were recovered and concentrated to dryness under vacuum using a rotary evaporator. The residues obtained after evaporation was stored at 4°C and used for further investigation.

Extraction of Total Tannins by Polyvinyl Polypyrrolidone (PVPP)

It consists in extracting the total polyphenols sample with acetone / water and using an insoluble matrix, polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), capable of complexing substance with tannins (polyphenols, high molecular weight) and to the determination of free polyphenols by the Folin-Ciocalteu (FAO/IAEA, 2000). Briefly, 2g of plant material is added to 100 mL of acetone / water 70%. After 24 hours of soaking, vacuum filtration, the filtrate was evaporated to dryness at 45 ° C. The resulting residue is dissolved in 5 ml distilled water (extract which contains tannins). Mix 100mg PVPP with 1mL of distilled water and 1mL of the extract, vortex and let t at 4°C for 15min and then centrifuged at 3000 tours/10 min. recover the supernatant because it represents only simple phenols as the tannins are precipitated with PVPP. The simple phenols can be assayed by the Folin-Ciocalteu (Makkar et al ; 1993).

Total Tanins Content Analysis

Since the total polyphenols were assayed in crude phenolic extract and the phenolic extract treated with PVPP, therefore the total tannin content is:

$$T= X-Y [33].$$

With T tannins content, X total polyphenols content and Y simpl phenols content.

Total Phenol Content Analysis

The Folin-Ciocalteu method, based on the reduction of phosphowolframite-phosphomolybdate complex by phenolics to blue reaction products, was used to determinate phenolic compounds (Blahova et al; 2004). An aliquot of 10 µl of the extract was added to 250 µl of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water). The mixture was allowed to stand for 3 min, then 2.5 ml of sodium carbonate Na₂CO₃ (7.5%, w/v) was added to the mixture. After 60 min in dark at room temperature, the absorbance of the solution was measured at 725 nm against a blank in a

spectrophotometer (Analytik jena, SPECORD 200 PLUS). Results were expressed as gallic acid equivalents dry weight extract (mg GAE/g DW).

Total Flavonoid Content Analysis

The estimation of the total flavonoids in the plant extract were carried out using the method of (Djeridane et al; 2006). Briefly, to 1ml of sample, 1ml of 2% AlCl_3 methanol solution was added. The content were incubated for 15min at room temperature and the absorbance was measured at 430nm in a spectrophotometer (Analytik jena, SPECORD 200 PLUS). Results were expressed as Catechine equivalents dry weight extract (mg CE/g DW).

Antioxidant Activity Determination

Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP)

The total reducing power of the OFI extracts was determined according to the method of (Oyaizu,1986) modified by (Amarowicz et al ; 2004) with ascorbic acid (AA), tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX) being used as the positive controls. Briefly, the OFI extracts (0.5 ml) were mixed with phosphate buffer (1.25 ml, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1.25 ml, 1%). After incubation at 50°C for 20 min, the reaction mixture was acidified with trichloroacetic acid (1.25 ml, 10%) and centrifuged for 10 min at 5000 rpm. The upper layer of solution (1.25 ml) was mixed with distilled water (1.25 ml) and FeCl_3 (0.25 ml, 0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm using a spectrophotometer (Analytik jena SPECORD 200 PLUS).

The ferric reducing power capacities of the plant extracts and standard antioxidants were expressed graphically by plotting absorbance against concentration. All analyses were run in duplicate and results averaged.

Determination of the Scavenging Effect on DPPH• Radicals

The hydrogen atom or electron donation abilities of some pure compounds were measured by the bleaching of a purple coloured methanol solution of the stable 2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The method of (Brand-Williams et al; 1995) was used. For each sample, different concentrations were tested. A 60 μl aliquot of different extract was mixed with 2440 μl of DPPH in methanol. After 60 min incubation in darkness, at ambient temperature, the resultant absorbance was recorded at 517 nm. A solution of DPPH in methanol alone was used as blank. DPPH• decreases significantly upon exposure to radical scavengers.

The percentage of the remaining DPPH• (for each remaining sample, at the steady state) was calculated as follows: %DPPH rem. = $[\text{DPPH}\cdot]_t / [\text{DPPH}\cdot]_{t=0}$

These values were then plotted against mg OFI extract/mg DPPH• to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH• concentration by 50% (EC50)

Evaluation of Total Antioxidant Capacity by Phosphomolybdenum Method

This assay is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the sample and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex at acidic pH (Prieto et al; 1999). An aliquot of 0.1ml of sample solution (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was combined in an eppendorf tube with 1mg of reagent solution (600mM sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). After the samples had incubated in thermal block at 95°C for 90 min and cooled to room temperature, the absorbance was measured at 695 nm against a blank (Ardestani & Yazdanparast, 2007). The antioxidant capacity of extracts was expressed as mg equivalent of ascorbic acid/g of dried weight (mg AAE/g extract).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Total Polyphenol, Total Flavonoids and Total Tannins in Cladodes of *Opuntia.ficus-indica*

It had been well documented that the phenolic content of plant materials is strongly associated with their antioxidant capacity (Skerget et al; 2005). Phenolics are the principal plant compounds with antioxidant capacity attributable to their redox properties, which exhibit an important function in neutralizing free radicals (Zheng & Wang, 2001). plant derived phenolics are well-known natural antioxidants and can contribute directly to the antioxidative action (Duh et al ; 1999). For that, total polyphenols, flavonoids and tannins were assessed. In the present study, the content of phenolic compound in cladodes of *Opuntia ficus-indica* was found to be 26.7 mg GAE/g DW and tannins 6.45mg/g, it were also found to contain 11.86 mg CE/g DW of flavonoids (table2), wicH are natural phenolic compounds and recognized antioxidants. Several studies revealed that antioxidant capacity of plant extracts was moderately high which are rich in flavonoids (Cakir et al; 2003). Finally, if we compare our results with those found by Ramirez-Moreno et al; 2012 who determined the levels of polyphenols cladodes of two species (*Opuntia ficus-indica*, cvs.Milpa Alta and Atlixco) were 5.71 and 3.82 mgGAE / gDW respectively, we conclude that our result is much higher.

Antioxidant Activity Evaluation

Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP)

The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides (Osawa, 1994). For the measurements of the reductive ability, it has been found that the Fe^{3+} - Fe^{2+} transformation occurred in the presence of extract samples which was postulated previously by Oyaizu (1986). Tanaka et al. have observed a direct correlation between antioxidant activities and reducing power of certain plant extracts (Tanaka et al ; 1988). The reducing properties are generally associated with the presence of reductones (Duh et al ; 1999), which have been shown to exert antioxidant action by breaking the free radical chain by donating a hydrogen atom (Gordon, 1990). In this assay, depending on the reducing power of antioxidant compounds, the yellow color of the test solution changes into various shades of green and blue. Therefore, by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm, we can monitor the Fe^{2+} concentration. The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity.

Reducing power of different extracts (phenolic compounds, flavonoids and tannins) of *Opuntia ficus-indica* and standards (AA, BHA, TROLOX) using the potassium ferricyanide reduction method were described in Figures 1.

The reducing power of different extracts (polyphenol compounds, flavonoids and tannins) of cladodes of *Opuntia ficus-indica* increased and correlated well with the increasing concentration. However, the reduction power of BHA, ascorbic acid and TROLOX was relatively more pronounced than that of the different extracts of cladodes of *Opuntia ficus-indica*. The ethyl acetate fraction of flavonoids has demonstrated the greatest reducing power ranged from 0.0 to 1.0 Abs for 0.2 mg/mL to 2 mg/mL of extract, followed by diethyl ether fraction, tannins and total polyphenols. Finally flavonoids n-butanol exhibited the lowest power reduction.

Free Radical Scavenging Activity

DPPH \cdot is a free radical compound and has been widely used to test the free radical scavenging ability of various samples (Hatano et al ;1997 ; Sakanaka et al ; 2005 ; Shimoji et al ; 2002) It is a stable free radical with a characteristic absorption at 517 nm, was used to study the radical-scavenging effects of extracts. As antioxidants donate protons to this radical, the absorption decreases. To evaluate the scavenging effects of DPPH \cdot of different extracts (polyphenol

compounds, flavonoids and tannins) of cladodes of *Opuntia ficus-indica*, DPPH inhibition was investigated. These results are shown as relative activities against BHA, TROLOX and AA. This activity was increased by increasing the concentration of the sample extract.

The activity of BHA was the highest, followed by ascorbic acid and TROLOX, polyphenol compounds, ethyl acetate flavonoids, n-butanol flavonoids, ethyl ether flavonoids and tannins respectively. Antioxidants, on interaction with DPPH, either transfer an electron or hydrogen atom to DPPH, thus neutralizing its free radical character (Naik et al ; 2003).

Similar results values were also found in IC₅₀ values, as shown in Table 2. IC₅₀ values (concentration of sample required to scavenge 50% free radical or to prevent lipid peroxidation by 50%) were found to be the least in polyphenols total (0.6 ± 0.103), followed by tannins (0.95 ± 0.007), flavonoids ethyl acetate (1.81 ± 0.009), flavonoids n-butanol (4.87 ± 0.057) and flavonoids ethyl ether (5.3 ± 0.021 mg/ml). Polyphenols compared with other extracts have the best reducing power and despite those high IC₅₀ than the flavonoids extract this can be explained by the existing synergy between all the compounds. A total polyphenol of cladodes of *Opuntia ficus-indica* is promising starting material for the isolation of compounds with antioxidant activities. There is a lack of information available on the chemical composition of *Opuntia ficus-indica* inducing antioxidant activity. Further phytochemical investigations on these extracts including fractionation are needed to isolate active constituents and subsequent pharmacological evaluation.

Total Antioxidant Capacity (TAC)

In the phosphomolybdenum assay, which is a quantitative method to evaluate water-soluble and fat-soluble antioxidant capacity (total antioxidant capacity). The extracts exhibited some degree of activity in a dose dependent manner. The extracts shown electron-donating capacity and thus they may act as radical chain terminators, transforming reactive free radical species into more stable non-reactive products (Dorman et al; 2003). Total antioxidant capacity of *Opuntia ficus-indica* cladodes extracts, expressed as equivalents of ascorbic acid is shown in Figures 2. The comparison between the extracts, tannins have a considerable antioxidant capacity (0.449 mgAAE /g) followed by polyphenols (0.442 mgAAE /g). Flavonoids have antioxidant activity which is classified as follows: Ether, acetate and n-butanol. We note that the tannins extracted from cladodes of *Opuntia ficus indica* showed antioxidant capacity of most interesting to the reduction of Mo (VI) Mo (V), so they are quantitatively and qualitatively high effective on phospholybdiqum test. The increase in antioxidant activity can be explained by the increase of the solvent polarity (Tian et al; 2009). Jung et al ; 2008 indicate that compounds extracted by ethyl acetate solvent are better hydrogen donors. Flavonoids two phases of ethyl acetate and n-butanol are known for their antioxidant activity and pro-oxidant (Birt et al; 2009; Rao et al; 2007) this has been demonstrated in both techniques DPPH and FRAP but in the following concern capacity total ethyl ether extract is that presented the highest activity (0.199 mgAAE/mg extract) followed by the ethyl acetate extract (0.169 mgAAE /mg extract) and then extract n-butanol (0.155 mgAAE/mg extract). This study clearly shows that all flavonoids extract may have some antioxidant activity. since the technical DPPH and FRAP ethyl acetate extract obtained the highest while the total antioxidant capacity showed the high reducing power of the ethyl ether extract reducing power, which is why it is necessary to assess the antioxidant by several technic.

CONCLUSIONS

This paper deals with antioxidant activity and phenolic compounds of Algerian cladodes of *Opuntia ficus-indica*. the extract showed significant activities in all antioxidant assays compared to the reference antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT), ascorbic acid (AA) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) in a

dose dependent manner. In DPPH scavenging assay the IC₅₀ value of total polyphenols extract of cladodes extract was the highest, followed by the extract tannins on the two extracts the IC₅₀ is higher than the AA reference. Total antioxidant activity was also found to increase in a dose dependent manner. Moreover, ethyl acetate extract of total flavonoids compounds showed good reducing power to the assays DPPH and Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) comparing with the other extracts but the best reducing power was found for phenolic compounds that can be explain with the senergy between different phenlic compound. These results suggest that *Opuntia cladodes* may act as a chemopreventive agent providing antioxidant poperties and offering effective protection from free radicals and support that opuntia is a promising source of natural antioxidant.

REFERENCES

1. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84:551-562.
2. Ardestani A, Yazdanparast R, (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104, 21-29.
3. ASERCA(1999). La tuna base del desarrollo del las culturas mesoamericanas. *Revista Claridades Agropecuarias*, 71, 9-44.
4. Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30, 40-47.
5. Betancourt-Dominguez MA, Hernandez-Pérez T, Garcia-Saucedo P, Cruz-Hernandez A, Paredes-Lopez O (2006). Physico-chemical changes in cladodes (nopalitos) from cultivated and wild cacti (*Opuntia spp.*). *Plant Foods Hum Nutr* 61 :115-119.
6. Birt D.F., Hendrich S., Wang W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90, 157-177.
7. Blahova E ; Brands Teterova E ; Fabulova A., 2004. Isolation and determination of phenolic compounds in fruit-green tea. *Journal of liquid Chromatography and related technology.* 27 (1). pp 31-48.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28:25-30.
9. Bruneton J, 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} éd. Lavoisier, Paris.1120 p.
10. Cakir A, Mavi A, Yildirim A, Duru ME, Harmandar M, Kazaz C (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L.by activity-guided fractionation. *J.Ethnopharmacol.* 87:73-83.
11. Cárdenas-Medellin, M. L., Serna-Saldivar, S. O., & Velazco, G. J. (1998). Efecto de la ingestión de nopal crudo y cocido (*Opuntia ficus indica*) en el crecimiento y perfil de colesterol total, lipoproteína y glucosa en sangre de ratas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 48, 317e323.
12. Cornal-Aguayo RD, Yahia EM, Crrillo-Lopez A, Gonzalez-Aguilar G (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J Agric Food Chem* 56:10498-10504.

13. Dauguet J.C., Foucher J.P., 1982. Plantes médicinales et phytothérapie. 16 (3)., pp 185-191.
14. Dehbi, Z., Radouane, A., 2000. Le Figuier de Barbarie à Ait Baamrane. Atout et perspectives de développement. Deuxième Journée Nationale sur la culture du Cactus, El Kelaa des Sraghna, Maroc. 2-5.
15. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006. Antioxydant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97, 654-660.
16. Dorman, H.J, Kosar M Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R, (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563-4569.
17. Duh PD, Tu YY, Yen GC (1999). Antioxidative activity of water extracts of Hamg jyur (*Chrysanthemum morifolium*). *LWT-Food Sci. Technol* 32:269-277.
18. Duh PD, Tu YY and Yen GC (1999). Antioxidant activity of the aqueous extract of ham jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm. Wiss Technol*. 32, 269-277.
19. Esam HM, Ali HK. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. *Food Chem* 2000; 69: 135-141.
20. FAO/IAEA.(2000). Quantification of tannins in tree foliage. FAO/IAEA. Working document IAEA, Vienna. P26.
21. Frati, A.C., Jimenez, E., Ariza, C.R., 1990. Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus indica* in non insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Phytother. Res*. 4, 195-197.
22. Galati EM, Monforte MT, Miceli N, Mondello MR, Taviano MF, Galluzzo M, Tripodo MM (2007). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat. *Phytother Res* 21:344-346.
23. M.H. Gordon (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. *In: B.J.F Hudson (Ed.), Food antioxidants Elsevier Applied Science, London*, pp. 1-18.
24. Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L., et al. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 525-532.
25. Hatano, T., Takagi, M., Ito, H., & Yoshida, T. (1997). Phenolic constituents of liquorice. VII. A new calcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenols. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 1485-1492.
26. Hegwood, D.A., 1990. Human health discoveries with *Opuntia* sp. (prickly pear). *Hort. Sci*. 25, 1515-1516.
27. Hernandez-Pérez T, Carrillo-Lopez A, Guevara-Lara F, Cruz-Hernandez A, Paredes-Lopéz O (2005). Biochemical and nutritional characterization of three prickly pear species with different ripening behavior. *Plant Foods Hum Nutr* 60:195-200.
28. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill MF, Judith A, Prior RL. Highthroughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agr Food Chem* 2002; 50: 4437-4444.
29. Jaramillo-Flores, M. E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-Álvarez, L., Gutiérrez-López, G. F., & Hernández-Sánchez, H. (2003). Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids

- and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Science and Technology International*, 9, 271e278.
30. Jung M. J., Heo S-I., Wang M-H. (2008). Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry* 108, 482-487.
 31. Kuti JO (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem* 85 :527-533.
 32. Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G., & Grisel, M. (2001). Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46, 69–79.
 33. Makkar H.P.S., Blummel M., Beker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.*, 6:161-165.
 34. Naik, G.H., Priyadarsini, K, I., Satav, J.G., Banavalikar, M.M., Sohoni, P.P., Biyani, M.K., et al. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63, 97-104.
 35. Nobel, P.S., 1988. *Environmental Biology of Agave and Cacti*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 270.
 36. T. Osawa (1994). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. *In: I. Uritani, V.V. Garcia, E.M. Mendoza* (Eds) *Post harvest biochemistry of plant food-materials in the tropics*. Japan Scientific Societies Press, Japan. pp. 241-251. M. Oyaizu (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.*, 44,307–315.
 37. Palevitch, D., Earon, G., Levin, I., 1993. Treatment of benign prostatic hypertrophy with *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. *J. Herbs, Spices Med. Plants* 2, 45-49.
 38. Panico, A.M., Cardile, V., Garufi, F., Puglia, C., Bonina, F.,& Ronsisvalle, G.(2005). Protective effects of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life Science*, 77(20), 2479-2488.
 39. Prieto P, Pineda M, Aguilar M, (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
 40. Ramirez-Moreno E, Cordoba-Diaz D, Sanchez-Mata M, Diez-Marqués C, Goni I (2012). Effect of boiling on nutritional, antioxidant and physicochemical characteristics in cladode (*Opuntia ficus indica*). *LWT-Food Sci.Technol* ???: 296-302.
 41. Rao Y.K., Geethangili M., Fang S-H., Tzeng Y-M. (2007). Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1770-1776.
 42. Rimm EB, Ascherio A, Grovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willet WC. Vegetable, fruits, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *J Am Med Assoc* 1996; 275:447-451.
 43. Rodríguez-Felix, A., & Cantwell, M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition*, 38, 83-93.
 44. Rodriguez-Garcia ME, de Lira C, Hernandez-Becerra E, Cornejo-Villegas MA, Palacios-Fonseca AJ, Rojas-Molina I, Reyonos R, Quintero LC, Del-Real A, Zepeda TA, Munoz-Torres C (2007). Physicochemical

- characterization of nopal pads (*Opuntia ficus-indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Hum Nutr* 62 ; 107-112.
45. Saenz, C., Estevez, A.M., Sepulveda, E., Mecklenburg, P., 1998. Cactus pear fruit : a new source for a natural sweetener. *Plant Foods Hum. Nutr.* 52, 141-149.
 46. Saenz,C., 2000. Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia spp.*) fruits and cladodes. *J.Arid Environ.* 46, 209-225.
 47. Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569-575.
 48. Shimoji, Y., Tamura, Y., Nakamura, Y., Nanda, K., Nishidai, S., Nishikawa, Y., et al. (2002). Isolation and identification of DPPH radical scavenging compounds in Kurosu (Japanese unpolished rice vinegar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6501-6503.
 49. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*89 :191-198
 50. Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research Technology*, 212, 396–407.
 51. M.Tanaka, C.W. Kuie, Y. Nagashima, T. Taguchi (1988). Applications of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakk.* 54, 1409–1414.
 52. Teles, F. F. F., Whiting, F. M., Price, R. L., & Borges, V. E. L. (1997). Protein and amino acids of nopal (*Opuntia ficus indica*). *Revista Ceres*, 44(252), 205–214.
 53. Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang G., Chen Y., Luo Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis* : The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, 173-179.
 54. Yu, Z. & Dahlgren, R.A. (2005). Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage. *J.Chem.Ecol.*, 26,2119-2140.
 55. Zheng W, Wang SY (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J.Argic.Food Chem.*49:5165-5170.

APPENDICES

Table 1: Total Phenolic, Flavonoid and Tannins Contents in Cladodes of *Opuntia-ficus indica*

Total Polyphenols Flavonoids		Tannins total (mgGAE/gDW)
(mgGAE/gDW)	(mgCE/mgDW)	
26.7±0.21	11.86± 0,03	6.45± 0.109

Values were performed in duplicates and represented as mean ± SD ($n=2$)

Mean values followed by different superscript in a column are significantly different ($p<0.05$).

Table 2: IC₅₀ (mg/ml) Values of Different Extracts of Algerian Cladode of *Opuntia-ficus indica*

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)	Logarithm Coefficient (r^2)
Polyphenols total	0.6±0.103	$r^2=0.9743$
Flavonoids ethyl ether	5.3±0.021	$r^2=0.7876$
Flavonoids ethyl acetat	1.81±0.009	$r^2=0.9869$
Flavonoids n-butanol	4.87±0.057	$r^2=0.9867$
Tannins	0.95±0.007	$r^2=0.9835$

Table 2: Contd.,

Ascorbic acid	0.13±0.002	r ² =0.8648
BHA	0.09±0.004	r ² =0.9428
TROLOX	0.149±0.002	r ² =0.8307

Values were performed in duplicates and represented as mean ± SD (n=2).

Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

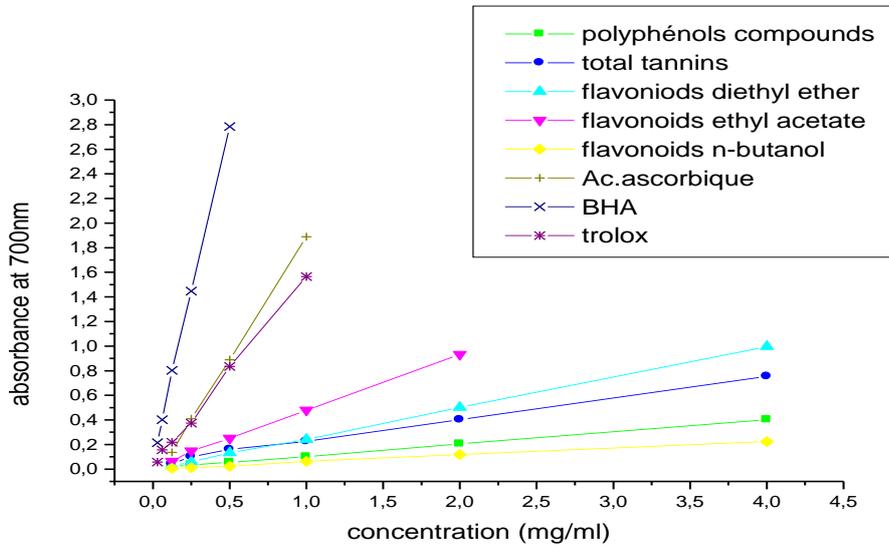


Figure 1: Total Reducing Power of Different Extracts (Polyphenols Compound, Flavonoids and Total Tannins) of Algerian Cladodes of *Opuntia ficus-indica*

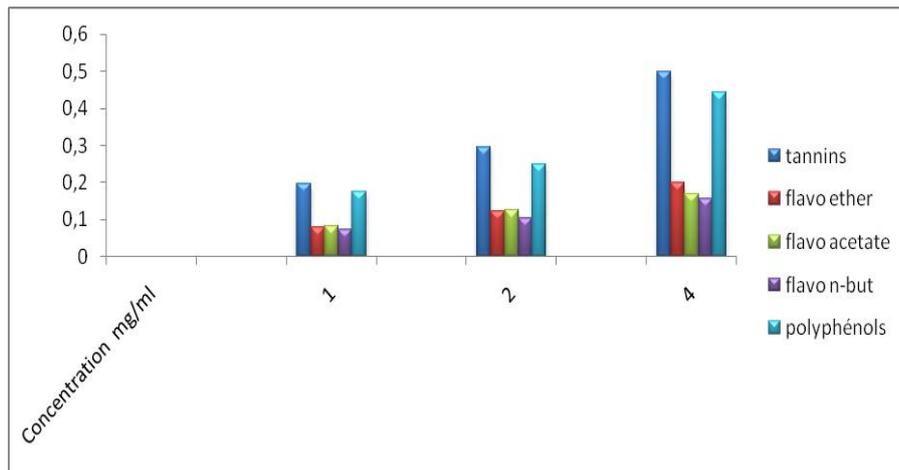


Figure 2: Total Antioxydant Capacity of Different Extracts (Polyphenols Compound, Total Flavonoids and Tannins) of Cladodes of *Opuntia ficus-indica*



Received on 01 April, 2014; received in revised form, 22 May, 2014; accepted, 17 July, 2014; published 01 October, 2014

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *OPUNTIA FICUS-INDICA* FLOWERS PHENOLIC EXTRACTS

H. Dib*, M. Belarbi, M.C Beghdad and M. Seladji

Laboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences of the Nature and the life, University of Tlemcen, Algeria

Keywords:

Opuntia ficus-indica, cactus, phenolic compounds, antioxydant activity, Free radical, Scavenging activity, β -carotene

Correspondence to Author:

H. Dib

Laboratory of Natural Products,
Department of Biology, Faculty of
Sciences of the Nature and the life,
University of Tlemcen, Algeria

E-mail: hanane.dib0@gmail.com

ABSTRACT: The cactus plant *Opuntia ficus-indica*, is a member of the cactaceae family, native to Mexico, mainly cultivated for its cladodes, flowers and fruits. *Opuntia* flower is useful in numerous fields; such as traditional medicines. Phenolic Flowers extracts of *opuntia ficus-indica* were phytochemical studied and in-vitro tested for their potential antioxydant activity using four methods, the total antioxidant capacity, reducing power, DPPH radical scavenging activity and β -carotene bleaching assay. The results showed the flowers richness by phenolic compounds and flavonoids (120.22mgGAE/gDW, 62.67mgGAE/gDW) and the different levels of high antioxidant properties for all extracts specially for the flavonoid ethyl acetate extract which showed the highest activity to reducing power, to scavenge DPPH radical with an IC_{50} of $0.27\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and to inhibit the oxidation of β -carotene with an IC_{50} of $0.39\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the latter is better than the capacity of inhibit the oxidation of β -carotene of ascorbic acid whose $IC_{50}=0.43\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Hence, the *Opuntia* flowers provide a source of natural antioxidant, suggesting that may be considered as a potential candidate of possible health-promoting functional foods.

INTRODUCTION: There is increasing evidence that fruits and vegetables may protect against numerous chronic diseases, including cancer, cardio- and cerebro-vascular, ocular, and neurological diseases^{1, 2, 3, 4}. The protective effect of vegetables has generally been attributed to their antioxidant constituents, including vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (α -tocopherol), carotenoids, glutathione, flavonoids and phenolic acid, as well as other unidentified compounds⁵.

Polyphenolic flavonoids are metabolic products widely distributed in foods of plant origin and they have numerous biological and pharmacological properties^{6, 7} that could potentially afford protection against chronic diseases. Natural foods have recently received immense attention from health professionals as well as the consumers in the wake of the discovery of their health-promoting potential. In this context, Cactus have emerged as promising candidates⁸.

The cactus plant *Opuntia* spp., a member of cactaceae family, is widely spread in Algeria arid and semi-arid region, it develops on the Mediterranean shore and particularly in Kabylie⁹. Different parts of *O. ficus-indica* are used in the traditional medicine of several countries: Many

QUICK RESPONSE CODE	DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(10).4574-82
	Article can be accessed online on: www.ijpsr.com
DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(10).4574-82	

uses of cactus pear fruit and cladodes are reported¹⁰, the cladodes are utilized to reduce serum cholesterol level and blood pressure, for treatment of ulcers, rheumatic pain, wounds, fatigue, capillary fragility, and liver conditions¹¹. Cladodes are also highly used for the food industry; they have been studied for their gelling properties¹². The fruits are rich in nutritional compounds, such as ascorbic acid and polyphenols. These fruits have shown antiulcerogenic¹³, antioxidant^{13, 14, 15}, anticancer¹⁶, neuroprotective¹⁷, hepatoprotective¹⁸ and antiproliferative activity¹⁹. The flower was little studied because of their limited bloom duration and in addition to that the difficulty to get them.

Opuntia flower is useful in traditional medicines thanks to its effect which are defined as depurative and in particularly diuretic and relaxant of renal excretory tract²⁰. Many kinds of flavonoids have been reported in *Opuntia* cactus and types and content vary with variety, tissue type, and maturation²¹. In the literature few reports are focused on *Opuntia* flowers. Bergaoui et al²² have reported the chemical composition of volatiles fractions from aqueous distillate obtained from three *Opuntia* species (*Opuntia lindheimeri*, *Opuntia macrohiza* and *Opuntia microdasys*). The recent study of De Léo et al²³ describes the chemical content of methanol extract *O. ficus-indica* flowers.

Therefore, to provide major information about the phytochemical composition of *O. ficus-indica* flowers, we performed the analysis of phenolic extracts of plant material from Algeria. The aim of the present work was to evaluate the polyphenol composition and antioxidant activity of the phenolic extracts isolated from *Opuntia* flowers.

MATERIALS AND METHODS:

Plant material: *Opuntia ficus-indica* inermis flowers were harvested in spring season of 2012 in the region of AIN YOUCEF, Tlemcen northwest of Algeria. In laboratory, flowers were dried under shade and grounded with Moulinex blinder, then stored in glass vials protected from light at -20°C which were used for extractions. All analyses were performed in duplicate.

Plants were identified at the laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems of University of Tlemcen (Algeria).

Extraction of chemical compounds from *Opuntia* flowers:

1. **Total phenolic compounds:** The dried flowers (10 g) were ground and extracted with acetone – water (70/30, v/v) by maceration at room temperature for 24 hours²⁴. The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure at 45°C and was stored at 4°C, for further investigation.
2. **Total flavonoids:** 10g of dried material were extracted with 100 ml of methanol (MeOH) and 5g of carbonat of Calcium by boiling for 1 hour²⁵. After filtration, the MeOH was evaporated under reduced pressure. Subsequently, recover the dry extract with 50 ml of boiling water. The aqueous extract was filtered and then fractionated by (solvent – solvent) extraction, first with Diethyl Ether, Ethyl acetate and then with n-butanol, using a separating funnel (Pyrex). All the fractions were concentrated and kept at 4°C.
3. **Tannins:** Tannins extraction from *Opuntia ficus-indica* flowers (5 g) was extracted at 4°C using 200 ml of a mixture of acetone – water (25/45, v/v) for 4 days²⁶. The extracts were filtered under vacuum through filter paper and acetone was evaporated under reduced pressure. Subsequently, the dichloromethane (2 x 25 ml) was used for the extraction of lipids and pigments from the aqueous extracts using a separating funnel. Afterward, the aqueous phase was extracted with 25 ml of ethyl acetate. This process was repeated 4 times. After filtration, the organic phases (ethyl acetate) containing tannins were recovered and concentrated to dryness under vacuum using a rotary evaporator. The residues obtained were weighed and preserved until uses.

Determination of total phenolics contents and tannins: Total phenolics contents of samples obtained from flowers phenolic extracts was determined using the Folin–Ciocalteu reagent according to the modified method of Singleton and Rossi²⁷ with gallic acid as standard. The amount of total phenolics compounds was calculated as mg of gallic acid equivalents (GAE) and expressed as mg gallic acid/g dry weight (DW) of the plant material. The calibration equation for gallic acid was ;

$$y = 3.180x - 0.030 ; (R^2 = 0.991)$$

where y is the absorbance and x is the concentration of gallic acid in mg/ml.

Using the same extract the tannins were estimated after treatment with polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)²⁸. One-hundred mg of PVPP was weighed into a 100×12 mm

Eppendorf tube and to this 1 mL distilled water and then 1 mL of the sample extracts were added. The content was vortexed and kept in the freezer at 4°C for 15 min. Then the sample was centrifuged at 1.681×g for 10 min at room temperature and the supernatant was collected. This supernatant has only simple phenolics other than the tannins (the tannins would have been precipitated along with the PVPP). The phenolic content of the supernatant was measured and expressed as the content of non-tannin phenolics on a dry matter basis. From the above results, the tannin content of the sample was calculated as follows:

$$\text{Tannins (\%)} = \text{Total phenolics (\%)} - \text{Non-tannin phenolics (\%)}$$

Determination of total Flavonoids contents: Total flavonoid content was determined according to Djeridane *et al*²⁹ using a method based on the formation of a flavonoid–aluminium complex, having the maximum absorbance at 430 nm. 1 mL of diluted sample (1mg/mL) was mixed with 1 mL of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) methanolic solution. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm with an Analytik jena, SPECORD 200 PLUS, spectrophotometer.

The concentrations of flavonoid compound were calculated according to the equation obtained from the standard Catechine graph.

The total flavonoid content was expressed as milligram of Catechine equivalent (CE) per gram of extract.

***In-vitro* antioxidant Activity Determination**

1. **Total Antioxidant Capacity by Phosphomolybdate Method:** The total antioxidant capacity of the plant extract/fraction was evaluated by measuring the absorbance of Mo(V) at 695nm³⁰. An aliquot of 0.2 mL of the sample solution was mixed with 2.0 mL of the reagent solution (600mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). The reaction mixture was incubated at 95°C for 60 minutes and absorbance was measured at 695 nm against a blank contained 2 mL of reagent solution. Total antioxidant capacity was expressed equivalent to ascorbic acid.

2. **DPPH Radical Scavenging Assay:** DPPH radical scavenging ability was measured using the method of Brand-Williams *et al*³¹. Sample (0.2 mL) was mixed with 2.8 mL DPPH solution (60 μmol·L⁻¹) and the mixture was allowed to stand for 30 min in the dark at room temperature. Absorbance was measured at 515 nm using a spectrophotometer. Trolox and Ascorbic acid were used as a comparison. Scavenging ability was calculated using the following formula:

$$\text{Scavenging ability (\%)} = [(\text{Absorbance 515 nm of control} - \text{Absorbance 515 nm of sample}) / \text{Absorbance 515 nm of control}] \times 100.$$

3. **Determination of reducing power:** The reducing power assay was determined according to the method of Oyaizu³² with little modification. The tested samples (0.1 ml) were mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (2.5ml, 1%). After the mixture was incubated at 50°C for 20 min. Trichloroacetic acid (2.5 mL, 10%) was added to each sample and centrifuged at 3000 rpm for 10 min.

A 5 ml aliquot of the upper layer was mixed with distilled water (5 ml) and ferric chlorid (1 ml, 0.1%) was added and then the absorbance was measured at 700 nm against a blank which consists of all the reagents without the tested sample. The higher absorbance indicated higher reducing power. The reducing power of Ascorbic acid and Trolox were also determined for comparison.

4. **β -carotene bleaching inhibition capacity assay:** The antioxidant activity of methanolic extracts was evaluated using a β -carotene-linoleate model system, as described by Moure et al.³³. Two milligrams of β -carotene were dissolved in 10 mL chloroform; and 1 mL of β -carotene solution was mixed with 20 μ L of purified linoleic acid and 200 mg of Tween 40 emulsifier. Chloroform was removed in a rotary vacuum evaporator and the resulting mixture was immediately diluted with 100 mL of distilled water. To an aliquot of 4 mL of this emulsion, 200 μ L of the methanolic solution of extracts or the reference antioxidants (Gallic acid and BHA) were added and mixed well.

The absorbance at 470 nm, which was considered at t = 0 min, was immediately measured against a blank, consisting of the emulsion without β -carotene. The capped tubes were placed in a water bath at 50°C for a period of 2 h. Thereafter, the absorbance of each sample was measured at 470 nm (A120). BHA was used for positive control. A negative control consisted of 200 μ L methanol instead of methanolic extract or BHA. All tests were repeated twice. The antioxidant activity (AA) was calculated according to the following equation:

$$AA = [(AA(120) - AC(120)) / (AC(0) - AC(120))] \times 100$$

Where AA(120) is the absorbance of the sample at t = 120 min; AC(120) the absorbance of the control at t = 120 min and AC(0) the absorbance of the control at t = 0 min.

Statistical analysis: All evaluations of dosage and antioxidant activity were performed in triplicate. Data were expressed as mean \pm standard derivation (SD).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Total phenolics content, Total Flavonoids and Tannins of *Opuntia ficus-indica* flowers: Flavonoids and phenolic compounds are well known as antioxidants. In various studies, antioxidant activity of plant extracts was found to be fairly high when they are rich in phenolic compounds³⁴. This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups³⁵. For that, total polyphenols, flavonoids and tannins were assessed in phenolic flowers extract. Results have clearly demonstrated the wealth of *Opuntia* flowers in phenolic compounds 120.22 \pm 1.00 mg GAE/g DW followed by a high level of flavonoids 62.67 \pm 0.15 mg CE/g DW and finally less rich in tannins 7.6867 \pm 0.05 mg GAE/g DW (**Table 1**).

Compared with cladodes of *Opuntia ficus-indica* this values were higher than those reported by Dib et al.³⁶. The study made by Alimi et al.³⁷ about phytochemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers extracted with 50% methanol solution has demonstrated a content greater than ours of total phenolic content (159.76 \pm 0.32 mg GAE / g of extract) in addition a higher flavonoids (79.51 \pm 0.57 mg RE/g of extract). This is why methanol is often used for extraction of medium polar and polar phenolic compounds such as flavonoid glycosides and phenolic acids³⁸. This richness of flowers of *Opuntia ficus-indica* in bioactive compounds suggests it as a good source of all investigated phytochemical.

Antioxidant Activity Evaluation: To the best of our knowledge, there are no reports in the literature concerning the antioxidant activity of *O. ficus-indica* flowers. Bioactive compound of flowers were subjected to screening for their possible antioxidant activities.

TABLE1: TOTAL PHENOLIC, FLAVONOID AND TANNINS CONTENT IN FLOWERS OF *OPUNTIA FICUS-INDICA*

Chemical constituent	Total phenolic Contents (mgGAE/gDW)	Total flavonoids content (mgQE/gDW)	Total Tannins Content (mgGAE/gDW)
Flowers	120.22±1.004	62.67±0.15	7.6867±0.05

The data are displayed with mean ± standard deviation of triplicate. Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

Owing to the complex reactive facets of phytochemicals, the antioxidant activities of plant extracts cannot be evaluated by only a single method, but at least two test systems have been recommended for the determination of antioxidant activity to establish authenticity³⁹. For this reason the antioxidant activity of various extracts of flowers of *O. ficus-indica* were determined by four spectrophotometric methods, total antioxidant capacity, scavenging activity of DPPH radical, reducing power assay and β-caroten/linoleic acid assay methods, at different concentrations.

Total Antioxidant Capacity (TAC): Total antioxidant capacity of *Opuntia* flowers phenolic extracts, expressed in equivalents of ascorbic acid. The extracts shown electron-donating capacity and thus they may act as radical chain terminators, transforming reactive free radical species in to more stable non-reactive products⁴⁰. The extracts exhibited some degree of activity in a dose dependent manner. The study revealed that all extracts have antioxidant capacity. The antioxidant activity of polyphenols was similar to that of tannins, ditto for flavonoid extracts (ethyl ether and n-butanol) from flowers of *Opuntia* (Table 2). Moreover ethyl acetate flavonoids extract have stronger antioxidant activity (0,406±0,05 mgAEE/g Extract) followed by tannins (0,14±0,005 mgAEE/g Extract) and polyphenols (0,121±0,004 mgAEE/g Extract). Flavonoids extracts have antioxidant activity which is classified as follows: acetate ethyl, n-butanol and ethyl ether.

We note that the ethyl acetate extracted from flowers of *Opuntia ficus indica* showed antioxidant capacity of most interesting to the reduction of Mo (VI) Mo (V), so they are quantitatively and qualitatively high effective on phospholybdique test, its confirmed by many recent studies which showing that many flavonoids and related polyphenols contribute significantly to the total

antioxidant activity of many fruits such as the red grape⁴¹, vegetables⁴² and medicinal plants⁴³.

Table 2: Total antioxidant capacity in *Opuntia ficus-indica* flowers extract

Bioactive Compunds	TAC (mgAEE/gDW)
Polyphenols	0.12 ± 0.004
Flavonoids (ethyl ether)	0.02 ± 0.005
Flavonoids (ethyl acetate)	0.406 ± 0.05
Flavonoids (n-butanol)	0.07 ± 0.002
Tannins	0.14 ± 0.005

The data are displayed with mean ± standard deviation of triplicate. Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

Determination of the Scavenging Effect on DPPH• Radicals: Free radical assay is one of the most widely used methods in establishing the antioxidant activity of herbal extracts and photochemical. DPPH is known to abstract labile hydrogen and the ability to scavenge the DPPH radical is related to the inhibition of lipid peroxidation⁴⁴. The scavenging activity was expressed by the percentage of DPPH reduction after 30min of reaction. The measurements were triplicate and their scavenging effects were calculated based on the percentage of DPPH scavenged^{45,46}.

Besides, the antioxidant potential of the phenolic compounds depends on the number and the arrangements of hydroxyls groups as well of the presence of constituents' donors of electrons⁴⁷. IC₅₀ values were found to be the least in ethyl acetate flavonoid extract IC₅₀ of 0.27±0.007 mg/ml, followed by n-butanol flavonoids extract IC₅₀ of 0.45±0.01 mg/ml, ethyl ether flavonoids extract IC₅₀ of 0.999±0.011 mg/ml, tannins IC₅₀ of 1.50±0.09 mg/ml and polyphenols IC₅₀ of 2.64±0.18 mg/ml (table 3). However, DPPH free radical scavenging of all the secondary metabolites tested

was lower than that of ascorbic acid and trolox (0.12 and 0.15 mg mL⁻¹). There is a lack of information available on the chemical composition of flowers from *Opuntia ficus-indica* inducing antioxidant activity.

Further phytochemical investigations on these extracts including fractionation are needed to isolate active constituents and subsequent pharmacological evaluation.

TABLE 3: DPPH IC₅₀ mg/ml VALUES OF DIFFERENT EXTRACTS OF *OPUNTIA FICUS-INDICA* FLOWER

Bioactive compounds	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)
Polyphenols	2.64 ±0.18
Flavonoids ethyl acetat	0.27 ±0.007
Flavonids n-butanol	0.45 ±0.01
Flavonids ethyl ether	0.999±.011
Tannins	1.50 ±0.09
Ascorbic acid	0.12 ±0.08
Trolox	0.152 ±0.049

The data are displayed with mean ± standard deviation of triplicate. Mean values followed by different superscript in a column are significantly different (p<0.05).

Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP): Tanaka *et al* observed a direct correlation between antioxidant activities and reducing power of certain plant extracts⁴⁸. The reducing properties are generally associated with the presence of reductones⁴⁹, which have been shown to exert antioxidant action by breaking the free radical chain by donating a hydrogen atom⁵⁰.

In this assay, depending on the reducing power of antioxidant compounds, the yellow color of the test solution changes into various shades of green and blue. Therefore, by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm, we can monitor the Fe²⁺ concentration.

Reducing power of different extracts (phenolic compounds, flavonoids and tannins) of *Opuntia ficus-indica* flowers and standards (Ascorbic acid and TROLOX) using the potassium ferricyanide reduction method were described in **Figure 1**. All phenolic extract of *Opuntia* flowers have indicated

a good reducing power but lower than that of the ascorbic acid and trolox. Unlike for ethyl acetat flavonoid extract which demonstrated the greatest reducing power, better than standards.

The high reducing effect of flowers extracts might be attributed to the presence of phytochemicals such as phenolic compounds⁵¹, flavonoids and tannins presented in our previous results, with high contents and this is confirmed with the study conducted by Ghalem *et al*⁵² which evaluated the ferric reducing antioxydant power of *Anthyllis vulneraria* L. flowers.

They concluded that polyphenols of *A. vulneraria* flowers had a highest value of FRAP while the flavonoids butanol extract was found to be less significant. Moreover, polyphenols and tannins extract were significantly more pronounced than that of Ascorbic acid.

Due the high total phenolic content of sample extract, these phenolic compounds represent the primary source of this antioxidant activity.

β-carotene bleaching inhibition capacity assay:

In this model system, β-carotene undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant. This is due to the oxidation of linoleic acid that generates free radicals that attacks the highly unsaturated β-carotene molecules. The presence of antioxidant avoids the destruction of the β-carotene conjugate system and the orange color is maintained⁵³. The obtained results are summarized in **table 4**.

The results show that all the extracts were capable of inhibiting the bleaching of β-carotene by scavenging linoleate-derived free radicals and were more effective in comparison with gallic acid. Most effective was ethyl acetat flavonoid extract (0.39±0.016 mg/ml) and tannins extract (0.41±0.051 mg/ml) of *Opuntia ficus-indica* flowers and were similar to high than gallic acid (0.43±0.008 mg/ml) but still lower than trolox (0.242±0.002 mg/ml).

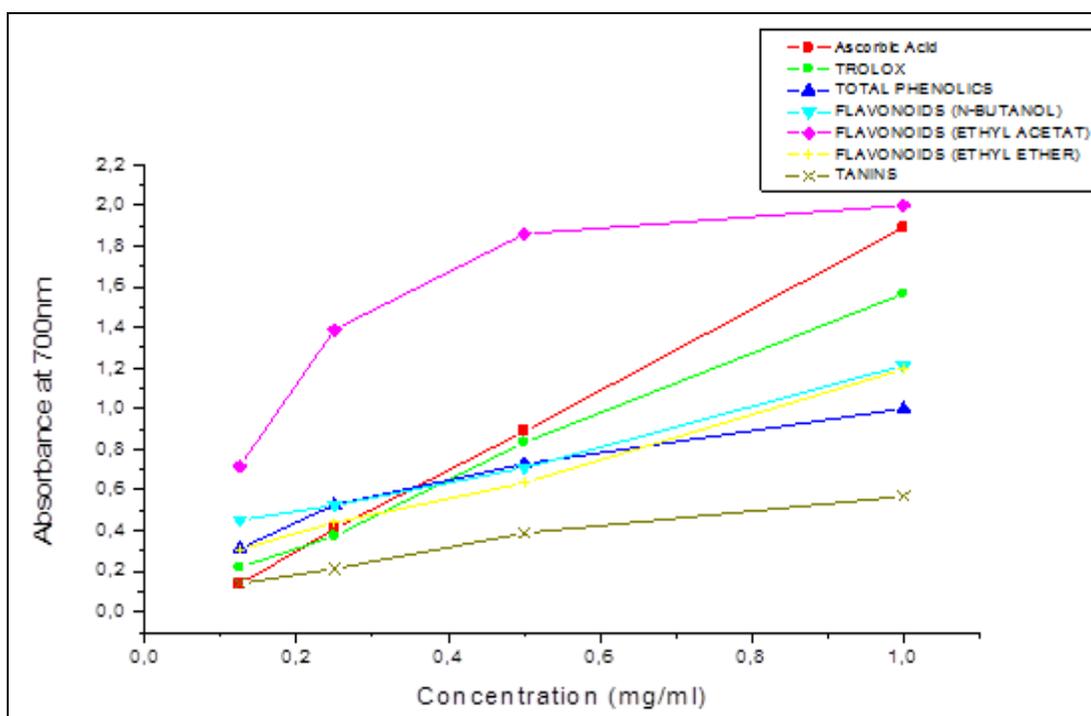


FIGURE 1: TOTAL REDUCING POWER OF DIFFERENT EXTRACTS (POLYPHENOLS COMPOUND, FLAVONOIDS AND TOTAL TANNINS) OF *OPUNTIA FICUS-INDICA* FLOWERS

TABLE 4: β -Carotene IC_{50} (mg/ml) VALUES OF DIFFERENT EXTRACTS OF *OPUNTIA FICUS-INDICA* FLOWERS

Bioactive Compounds	β -carotene IC_{50} (mg/ml)
Polyphenols	1.04 \pm 0.05
Flavonoids ethyl acetat	0.39 \pm 0.016
Flavonids n-butanol	1.26 \pm 0.045
Flavonids ethyl ether	4.42 \pm 0.04
Tannins	0.41 \pm 0.051
Gallic acid	0.43 \pm 0.008
Trolox	0.242 \pm 0.0028

The data are displayed with mean \pm standard deviation of triplicate. Mean values followed by different superscript in a column are significantly different ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The results present in this study are the first information on the chemical composition and antioxidant activities of *Opuntia* flowers. The phenolic extracts of *O. ficus-indica* flowers contained high level of total phenolic and flavonoid compounds and were capable of inhibiting radicals and acting as reducing agents. Accordingly in this study, a significant and linear relationship was found between the antioxidant activity and phenolic content, indicating that phenolic compounds could be major contributors to antioxidant activity. As for the chemical composition, amounts and nature of compounds vary with flowering stages and species, suggesting changes in secondary metabolism of flowers²⁰.

This richness of *Opuntia* flowers in interesting compounds can support the utilization of these flowers in various fields of application including agro-alimentary, cosmetic and pharmaceutical.

REFERENCES:

- Block G, Patterson B and Subhar A, Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutrition & Cancer*, 1992; 18:1–29.
- Ness AR and Powles JW, Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 1997; 26:1–13.
- Steinmetz KA and Potter JD, Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *Journal American Dietetic Association*, 1996; 97:1027–1039.
- Youdim KA and Joseph JA, A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001; 30:583–594.
- Sies H and Stahl W, Vitamins E and C, beta;-carotene and carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995; 62:1315 s-1321s.
- Cook NC and Samman S, Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 1996; 7:66–76.
- Hollman PCH, Hertog MGL and Katan MB, Analysis and health benefits of flavonoids. *Food Chemistry*, 1996; 57:43–46.
- Patel S, Reviewing the prospects of *Opuntia* pears as low cost functional foods. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2013; 12:223–234.
- Chougui N, Louaileche H, Mohedeb S, Mouloudj Y, Hammoui Y and Tamendjari A, *African Journal of Biotechnology*, 2013; 12:299–307.

10. Hoffmann W, The many uses of prickly pear (*Opuntia* Mill.) in Peru and Mexico. *Plant Res. Dev*, 1980; 12:58–68.
11. Agozzino P, Avellone G, Caraulo L, Ferrugia M and Flizzola F, Volatile profile of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) by SPME-GC/MS analysis. *Italian Journal of Food Science*, 2005; 17:341–348.
12. Sepúlveda E, Saenz C, Aliaga E and Aceituno C, Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J. Arid Environ*, 2007; 68:534–545.
13. Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S and Taviano MF, Chemical characterization and biological effects of sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51:4903–4908.
14. Kuti JO, Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 2004; 85:527–533.
15. Tesoriere L, Butera D, Pintaudi M, Allegra M and Livrea, M.A, Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with Vit. C. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004; 80:391–395.
16. Zou DM, Brewer M, Garcia F, Feungang JM., Wang J, Zang R., Liu H and Zou C, Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 2005; 4:25–36.
17. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS and Cho J, Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus indica* var. saboten. *Brain Research*, 2003; 965:130–136.
18. Galati EM, Mondello MR, Lauriano ER, Traviano MF, Galluzzo M. and Miceli N, *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury. *Phytotherapy Research*, 2005; 19:796–800.
19. Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR., Reddy TC, Reddy GV and Reddanna, P, Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*, 2007; 14:739–746.
20. Ammar I, Ennouri M, Khemakhem B, Yangui T, Attia H, Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*, 2012; 37:34–40.
21. Wallace RS, *Biochemical taxonomy and the Cactaceae*. *Cactus & Succulent Journal (USA)*, 1986; 58:35–38.
22. Bergaoui A, Boughalleb N, Ben Jannet H, Harzallah-Shiric F, El Mahjoub M and Mighri Z, Chemical composition and antifungal activity of volatiles from three *Opuntia* species growing in Tunisia. *Pak. J. Biol. Sci*, 2007; 10:2485–2489.
23. De Léo M, De Abreu MB, Pawlowska AM, Cioni PL and Braca A, Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA–ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochem. Lett*, 2010; 3:48–52.
24. Yu Z and Dahlgren RA, Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage. *J.Chem. Ecol*, 2005; 26:2119 – 2140.
25. Dauguet JC and Foucher JP, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1982; 16:185-191.
26. Bruneton J, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3ème éd. Lavoisier, Paris, 1999; 1120 p.
27. Singleton V, Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, 1965; 16:144–158.
28. Siddhuraju P, Manian S, The antioxidant and free radical scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) seeds. *Food Chem*, 2007; 105:950-958.
29. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N, Antioxydant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 2006; 97:654-660.
30. Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah AS, Babji AS, Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *Afr J Biotechnol*, 2009; 8; 484-489.
31. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol*, 1995; 28:25-30.
32. Oyaizu M, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986; 44:307-315.
33. Moure A, Franco D, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ and Lema JM, Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48:3890–3897.
34. Cakir A, Mavi A, Yıldırım A, Duru ME, Harmandar M and Kazaz C, *J. Ethnopharmacol*, 2003; 87:73-83.
35. Oke F, Aslim B, Ozturk S and Altundag S, *Food Chem*, 2009; 112:874-879.
36. Dib H, Beghdad MC, Belarbi M, Seladji M and Ghalem M, Antioxidant activity of phenolic compound of the cladodes of *Opuntia ficus-indica* MILL. From northwest Algeria. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 2013; 3:147-158.
37. Alimi H, Hfaiedhc N, Bouonia Z, Saklyb M and Ben Rhoumab K, Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2011; 32:406–416.
38. [Harborne JB, *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd edn. Chapman and Hall, London, England 1998.
39. Schlesier K, Harwat M, Bohm V and Bitsch R, *Free Rad. Res*, 2002; 36:177-187.
40. Dorman HJ, Kosar M, Kahlos K, Holm Y and Hiltunen R, Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51:4563-4569.
41. Negro C, Tommasi L and Miceli A, Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 2003; 87: 41–44.
42. Luo XD, Basile MJ and Kennelly EJ, Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 1379–1382.
43. Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H and Marzouk B, Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 2008; 331:48–55.
44. Matsubara N, Fuchimoto S, Iwagaki H, Nonaka Y, Kimura T, Kashino H, Edamatsu R, Hiramatsu M and Orita K, The possible involvement of free radical scavenging properties in the action of cytokines. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1991; 71:239-242.

45. Blois MS, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958; 29:1199-1200.
46. Singh R, Singh N, Saini BS, Rao HS, In vitro antioxidant activity of pet ether extract of black pepper. *Ind J Pharmacol*, 2008; 40:147-151.
47. Lapornik B, Prosek M, Wondra AG, Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng*, 2005; 71:214–222.
48. Tanaka M, Kuie CW, Nagashima Y and Taguchi T, Applications of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakk*, 1988; 54:1409–1414.
49. Duh PD, Tu YY, Yen GC, Antioxidative activity of water extracts of Hamg jzur (*Chrysanthemum morifolium*). *LWT-Food Sci. TechnoL*, 1999; 32:269-277.
50. Gordon MH, The mechanism of antioxidant action in vitro. *In: B.J.F Hudson (Ed.), Food antioxidants Elsevier Applied Science London*, 1990; 1-18.
51. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 2008; 331:372–379.
52. Ghalem M, Merghache S, Ghalem S and Belarbi M, Phenolic contents and *in-vitro* antioxidant activity of some secondary metabolites of *Anthyllis vulneraria* L. from Algeria. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 2012; 2:51-64.
53. Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linszen, AG and Lyuba NE, Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*, 2002; 13:8-17.

How to cite this article:

Dib H, Belarbi M, Beghdad MC and Seladji M: Antioxidant activity of *Opuntia ficus-indica* flowers phenolic extracts. *Int J Pharm Sci Res* 2014; 5(10): 4574-82. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(10).4574-82

All © 2014 are reserved by International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **ANDROID OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Playstore)

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, de l'Ouest d'Algérie, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des métabolites secondaires (phénols totaux, flavonoïdes, tanins, et huiles essentielles) ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de cinq espèces végétales *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* et *Schinus molle*.

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants: Capacité antioxydante totale CAT, piégeage du radical libre DPPH, réduction de fer et blanchiment du β -carotène. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des micro-dilutions en milieu liquide. L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* et *Schinus molle* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CG) et CG couplée à la spectrométrie de masse ainsi que la RMN ^{13}C sans séparation préalable.

Les résultats obtenus ont montré une remarquable richesse des différentes parties des cinq plantes étudiées en métabolites secondaires à savoir: polyphénols, flavonoïdes, tanins et huiles essentielles. Les espèces *N. nepetella*, *M. rotundifolia* et *Atriplex canescens* se sont montrées riches en polyphénols dont la teneur varie entre 20,75 et 58,11 mg équivalents d'acide gallique (EAG)/ gramme de matière (MS). Pour les autres plantes, le contenu en polyphénols est compris entre 3,52 et 10,75 mg EAG/g MS. Les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés exprimés en équivalent de catéchine sont de l'ordre de 0,59 à 4,57 mg/g et 0,2 à 1,5 mg/g respectivement. Les résultats de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles varient quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée. 21 composés ont été identifiés dans les huiles essentielles de *N. nepetella* représentant 91,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, 17 pour les fleurs (92,9%) et 22 composés pour la partie aérienne (88,3%), le constituant nepetalactone 4aa,7a,7a β est le prépondérant. 42 composés pour les parties aériennes ainsi que pour les feuilles, représentant 91,8% et 93,9% respectivement ont été identifiés dans les huiles de *M. rotundifolia* présentant le menthone, la pulégone et l'isomenthone comme constituants majoritaires. Pour *S. molle* 35 composés ont été identifiés représentant 89,3% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles, et 39 pour les fruits (68,6%) avec l'alpha phellandrène comme constituant majoritaire au niveau des feuilles.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits des espèces végétales étudiées présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. Comparés aux autres espèces, les extraits des tanins des feuilles et des tiges de *M. rotundifolia* ont une importante activité de piégeage du radical libre DPPH (valeurs des IC_{50} : 0,12 mg/ml et 0,08 mg/ml respectivement) comparable à celle des antioxydants de synthèse acide ascorbique et butylhydroxyanisole. Par ailleurs, ces extraits de *M. rotundifolia*, ceux méthanoliques des feuilles et des tiges de *N. nepetella*, ceux de *S. molle* et celui des tanins des tiges d'*A. canescens* ont montré une bonne capacité à inhiber le blanchiment du β -carotène. Concernant les autres extraits, *M. rotundifolia* et *S. molle* sont moins importants mais intéressants comparativement aux extraits de *M. arvensis* et *A. canescens* qui ont des activités plus faibles.

La majorité des extraits testés n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées. Cependant, Les huiles essentielles des différentes parties de *N. nepetella*, de *M. rotundifolia* et de *S. molle* montrent une sensibilité aux différentes souches testées et en particulier vis-à-vis des levures et des moisissures. De même, les huiles essentielles des parties aériennes de *M. rotundifolia* se sont avérées les plus actives en particulier contre *Staphylococcus aureus* avec un CMI et une CMB de l'ordre de 1,25 μ /ml.

Mots clés : *Nepeta nepetella*; *Mentha rotundifolia*; *Moricandia arvensis*; *Atriplex canescens*; *Schinus molle*; polyphénols; flavonoïdes; tanins; huiles essentielles, composition chimique, activités antioxydantes; activités antimicrobiennes.

Abstract

As part of the discovery of new active molecules from natural sources, we were interested in this work to the study of secondary metabolites (total phenols, flavonoids, tannins, and essential oils) and evaluation of antioxidant and antimicrobial extracts from five plant species in western Algeria: *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* and *Schinus molle*.

The polyphenol contents were determined by spectrophotometric techniques. The antioxidant activities were determined in vitro through the following evaluation tests: Total antioxidant capacity TAC, DPPH assay, Ferric reducing antioxidant power FRAP and inhibition of bleaching β -carotene. Moreover, determination of antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method and that of liquid-based micro-dilutions. The study of the chemical composition of essential oils of *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* and *Schinus molle* was performed by gas chromatography (GC) and GC with mass spectrometry and ^{13}C RMN. The results obtained showed a remarkable wealth of different parts of the five plants studied secondary metabolites namely polyphenols, flavonoids, tannins and essential oils. The species *N. nepetella*, *M. rotundifolia* and *Atriplex canescens* have proved rich in polyphenols, whose content varies between 20.75 and 58.11 mg EAG / g DM. For other plants, the polyphenol content is between 3.52 and 10.75 mg EAG / g DM. The contents of flavonoids and condensed tannins expressed as catechin equivalents are in the range of 0.59 to 4.57 mg / g and 0.2 to 1.5 mg / g respectively. The study of the chemical composition of essential oils was carried out by GC, GC / SM and RMN ^{13}C .

The results of chemical analysis of these essential oils vary quantitatively depending on the part of the plant studied. The study of essential oils *N. nepetella* identified 21 compounds representing 91.3% of the total composition of the essential oil from the leaves, the flowers 17 (92.9%) and compound 22 aerial part (88.3%), that of *M. rotundifolia* identified 42 compounds for the aerial part and for leaves, representing 91.8% and 93.9% respectively, and that of *S. molle* allowed identified 35 compounds representing 89.3% of the total composition of the essential oil from the leaves, fruit and 39 (68.6%).

The methods of the antioxidant activity show that all samples studied plant species exhibit antioxidant properties in different levels. Compared to other species, extracts tannins from leaves and stems of *M. rotundifolia* have significant scavenging activity of free radical DPPH (IC_{50} values of 0.12 mg / ml and 0.08 mg / ml respectively) comparable to that of the synthetic antioxidants ascorbic acid and butylated hydroxyanisole. Moreover, these extracts of *M. rotundifolia*, those methanolic leaves and stems of *N. nepetella*, those *S. molle* and tannins stems from *A. canescens* showed good ability to inhibit β -carotene bleaching. Regarding other extracts, *M. rotundifolia* and *S. molle* are less important but interesting compared to extracts from *M. arvensis* and *A. canescens* which have lower activities. Most extracts tested had no inhibitory effect against the growth of all microbial strains tested. However, Essential oils of different parts of *N. nepetella*, *M. rotundifolia* and *S. molle* show sensitivity to different tested strains and in particular to the yeasts and molds. Similarly, the essential oils of the aerial parts of *M. rotundifolia* proved most active in particular against *Staphylococcus aureus* with MIC and MBC of about 1.25 μ /ml.

Keywords: *Nepeta nepetella*; *Mentha rotundifolia*; *Arvensis Moricandia*; *Atriplex canescens*; *Schinus molle*; Polyphenols; Flavonoids; Tannins; essential oils, chemical composition, antioxidant activities; antimicrobial activities.

ملخص

في إطار اكتشاف جزيئات جديدة نشطة من مصادر طبيعية، اهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الثانوية (متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية والزيوت العطرية) وتقييم النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات لمستخلصات خمسة أنواع من النباتات من الغرب الجزائري: *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens* و *Schinus molle*. تم تحديد محتويات متعدد الفينول من خلال تقنيات الطيف الضوئي. وتم تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة، مخبريا، من خلال الطرق التالية: القدرة المضادة للأكسدة الكلية، تثبيط الجذر الحر DPPH، والقدرة على إرجاع الحديد وتثبيت إزالة لون البيتا كاروتين. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة الانتشار القرصي وطريقة التخفيف في وسط سائل. كما قمنا أيضا بدراسة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية ل *Nepeta nepetella* و *Mentha rotundifolia* بواسطة التحليل الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية مقرونة بمطيافية الكتلة والطنين النووي المغناطيسي للكربون 13 من دون فصل مسبق للزيوت العطرية. أظهرت النتائج المحصل عليها أن مختلف أجزاء النباتات الخمس تحتوي على نسب عالية من المركبات الثانوية: متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية والزيوت العطرية. النباتات التالية: *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* و *Atriplex canescens* أظهرت عن محتويات مرتفعة في ما يخص متعدد الفينول بكميات تراوحت بين 20.75 إلى 58.11 مع معادل حمض الغاليك/غ من المادة الجافة. أما بالنسبة للنباتات الأخرى، فكان محتواها مترواحا بين 3.52 إلى 10.75 مع معادل حمض الغاليك/غ من المادة الجافة. محتوى النباتات في ما يخص الفلافونويدات والمركبات العفصية تراوح بين 0.59 إلى 4.57 مع معادل الكاتشين/غ من المادة الجافة وبين 0.2 إلى 1.5 مع معادل الكاتشين/غ من المادة الجافة، بالترتيب.

أظهرت نتائج دراسة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية اختلافا كيميا على حسب الجزء من النبات. تم تحديد 21 مركبا في الزيوت العطرية ل *Nepeta nepetella* والتي تمثل 91.3% من التركيبة الإجمالية للزيوت العطرية للأوراق، و 17 مركبا بالنسبة للأزهار (92.9%)، و 22 مركبا بالنسبة للجزء الجوي لهذه النبتة (88.3%). المركبة الألفا فيلاندرين كمركب رئيسي في الزيوت العطرية للأوراق، وهو ما يمثل 91.8% و 93.9% على الترتيب، في الزيوت العطرية ل *Mentha rotundifolia* مع مركب المنون، البيلاجون و الإيزومتون كمكونات رئيسية. بالنسبة ل *Schinus molle*، 35 مركبا تم تحديدهم والذي يمثل 89.3% من إجمالي التركيبة الإجمالية للزيوت العطرية للأوراق و تم تحديد 39 مركبا بالنسبة للثمار (68.6%) مع مركب الألفا فيلاندرين كمركب رئيسي في الزيوت العطرية للأوراق.

مختلف طرق دراسة النشاط المضاد للأكسدة تبين أن جميع المستخلصات للنباتات المدروسة تملك خصائص مضادة للأكسدة لكن بمستويات مختلفة. مستخلصات المركبات العفصية لأوراق *Schinus molle* و *Mentha rotundifolia* أظهرت النشاط المضاد للأكسدة العالي بالمقارنة مع مستخلصات النباتات الأخرى. تم الحصول على أفضل نشاط مقارنة مع المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية، من خلال طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH متقلة بقيمة IC_{50} ب 0.12 مع/مل و 0.08 مع/مل، على الترتيب. مستخلصات الكحول الميثيلي لأوراق و سيقان نبتة *Nepeta nepetella* و *Schinus molle* بالإضافة إلى مستخلص المركبات العفصية لسيقان نبتة *Atriplex canescens* أظهرت قدرة جيدة على تثبيط إزالة لون البيتا كاروتين. أما في ما يخص مستخلصات نبتتي *Mentha rotundifolia* و *Schinus molle*، فقد أبانوا عن نشاط مضاد للأكسدة معتبر لكنه أكثر أهمية مقارنة بمستخلصات *Moricandia arvensis* و *Atriplex canescens*.

مع ذلك، أظهرت الزيوت العطرية لمختلف أجزاء *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia* و *Schinus molle* حساسية لمختلف السلالات المجرية وخاصة اتجاه الخمائر والفطريات. أظهرت أيضا الزيوت العطرية للجزء الجوي لنبتة *Mentha rotundifolia* نشاطا فعالا اتجاه البكتيريا العنقودية الذهبية أدنى حد تركيز مثبط 1,25 μ /ml.

الكلمات المفتاحية: *Nepeta nepetella*, *Mentha rotundifolia*, *Moricandia arvensis*, *Atriplex canescens*, *Schinus molle*, متعدد الفينول، الفلافونويدات، المركبات العفصية، الزيوت العطرية، التركيب الكيميائي، الأنشطة المضادة للأكسدة، الأنشطة المضادة للميكروبات.