

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif - 1
Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس - سطيف 1-
كلية علوم الطبيعة والحياة

N°...../SNV/2014

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté par

FERDJIOUI Siham

Pour l'obtention du diplôme de

Magister en Biologie

Option: Biochimie

THEME

**Activités antioxydante et antimicrobienne des
extraits méthanoliques et de l'huile essentielle
de la plante *Mentha rotundifolia*.**

Soutenue publiquement le 11/06/ 2014

DEVANT LE JURY

Président :	Mr. Mahdadi Rachid	Dr. Université de Sétif
Rapporteur :	Mr. Belhattab Rachid	Pr. Université de Sétif
Examineur :	Mr. Laouer Hocine	Pr. Université de Sétif
	Mr. Zerroug Mohamed Mihoub	Dr. Université de Sétif

Remerciement

*Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de **DIEU**, qui m'a offert santé, force, patience et volonté jusqu'au dernier moment. Je te remercie **DIEU** pour ça et pour tout le reste.*

*Grand et respectueux remerciement va d'abord au prophète **MOHAMED** -paix et bénédiction d'Allah sur lui- qui nous a appris tous ce qu'est beau dans la vie.*

« Celui qui ne remercie les gens ne remercie guère Dieu ».

Alors, Il ne me serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Belhattab Rachid pour avoir accepté de m'encadrer, pour sa gentillesse, ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.

Je remercie également Mr le docteur Mahdadi Rachid, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie Mr le Professeur Laouer Houcine, de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de ce mémoire.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr le docteur Zerroug Mohamed Mihoub, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je voudrais adresser un remerciement particulier plein de reconnaissance et de gratitude au Dr. Mahdadi Rachid et M^{me} El koli Mariem, je ne serai jamais oublier leur bienfaisance.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux personnels du laboratoire de bactériologie de l'hôpital mère et enfant d'El Eulma pour leur assistance et leur sympathie en particulier M^{elle} karima.

Je n'oublier pas de remercier mes chers amis qui m'ont donné sans rien de retour en particulier M^{me} Wafa Zaibet, M^{elle} Hallal Shahinez, M^{me} Bahloule Abida, Lamia, Nore et Salma.

Enfin, mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

A mes Parents, sans qui, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, la conséquence de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

A ma sœur et mes frères qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et confiance.

A mes belles –sœurs, mes neveux et mes nièces pour les sympathiques moments qu'on passe ensemble.

Ainsi qu'à tous mes amis.

Résumé

Les recherches actuelles sont focalisées sur les molécules douées d'activités biologiques d'origine naturelle. L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de deux extraits méthanoliques obtenus par macération (EMM) et au Soxhlet (EMS) et de l'huile essentielle (HE) obtenu par hydrodistillation des parties aériennes de la plante *Mentha rotundifolia*, Les rendements respectifs sont: 16.05 % (m/m), 09.2 % (m/m) et 0.7 % (v/m). Le screening phytochimiques a permis de mettre en évidence la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, et quinones dans les extraits méthanoliques. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 141.571 ± 0.143 (EMM) et 168.642 ± 1.642 (EMS) $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait. Les flavonoïdes et les flavones et flavonols ont été évalués par la méthode utilisant AlCl_3 , la teneur en flavonoïdes est estimée à 15.636 ± 0.030 (EMM) et 33.045 ± 0.76 (EMS) $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. Le dosage des flavones et flavonoles a révélé des teneurs de 42.6 ± 1.357 (EMM), 47.071 ± 3.214 (EMS) $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. La composition de l'huile essentielle a été déterminée par GC et GC/MS permettant l'identification de 43 constituants, l'oxyde de trans-pipéritène est le constituant le plus dominant (66.39%). L'activité antioxydante des trois extraits a été évaluée *in vitro* par plusieurs tests. Dans le cas du test de DPPH, les IC_{50} sont de $265,491 \pm 2.221$ $\mu\text{g/ml}$, 133.160 ± 11.346 $\mu\text{g/ml}$ et $1755 \pm 0,006$ $\mu\text{g/ml}$ pour EMM, EMS, et l'HE respectivement. Pour le test de chélation du fer ferreux, seul les extraits méthanoliques ont montré une activité avec des valeurs de EC_{50} de 3.417 ± 0.011 mg/ml , 2.194 ± 0.038 mg/ml pour EMM, EMS respectivement. Le pouvoir réducteur du fer a manifesté des EC_{50} de 550.325 ± 3.613 $\mu\text{g/ml}$, 468 ± 1 $\mu\text{g/ml}$, 1625.5 ± 0.004 $\mu\text{g/ml}$ pour EMM, EMS, et l'HE respectivement. Les résultats de cette activité semblent être faibles par rapport aux témoins positifs. L'effet antimicrobien a été évalué par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de sept souches microbiennes (quatre bactéries et trois champignons). Les résultats révèlent que les extraits méthanoliques n'ont aucun effet antimicrobien. Cependant, l'huile essentielle a exercé un effet considérable sur les champignons et moyen sur les bactéries.

Mots clés: Les métabolites secondaires, *Mentha rotundifolia*, activité antioxydante, activité antimicrobiennes.

Summary

Actually, most investigation of current research focuses to study the biologically active compounds from natural molecules. The objective of this study is the evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of two methanolic extracts obtained by maceration (MEM) and by Soxhlet apparatus (MES) and the essential oil (EO) obtained by hydrodistillation from the aerial parts of *Mentha rotundifolia*, the yields were 16.05 % (w/w), 09.2 % (w/w) and 0.7 % (v/w), respectively. The phytochemical screening led to identify polyphenols, flavonoids, tannins, terpenoids and quinons in the methanolic extracts. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent and found to be 141.571 ± 0.143 (MEM) and 168.642 ± 1.642 (MES) $\mu\text{g AGE/mg}$ of extract. Flavonoids, flavons and flavonols were evaluated by AlCl_3 method, the values of flavonoids are 15.636 ± 0.030 (MEM) and 33.045 ± 0.76 (MES) $\mu\text{g QE/mg}$ of extract. The levels of flavons and flavonols were estimated to be 45.426 ± 1.357 (EMM) 47.071 ± 3.214 (MES) $\mu\text{g QE/mg}$ of extract. Essential oils analyzed by GC and GC/MS allowed to identification of 43 constituents dominated by trans-piperitenone oxide (66.39%). The antioxidant activity of the extracts was evaluated in vitro by many tests. Concerning the DPPH test; The IC_{50} were: $265,491 \pm 2.221$ $\mu\text{g/ml}$, 133.160 ± 11.346 $\mu\text{g/ml}$ et $1755 \pm 0,006$ $\mu\text{g/ml}$ for EMM, EMS and EO respectively. For the test of ferrous ion chelating, only methanolic extracts have activity with EC_{50} of 3.417 ± 0.011 mg/ml , 2.194 ± 0.038 mg/ml for EMM, EMS and EO respectively. The results also illustrate that the three extracts demonstrate reducing power with EC_{50} of 550.325 ± 3.613 $\mu\text{g /ml}$, 468 ± 1 $\mu\text{g /ml}$, 1625.5 ± 0.004 $\mu\text{g /ml}$ for MEM, MES and EO respectively. The effects of extracts seem to be weak when compared with standards effect. Antimicrobial effect of the methanolic extracts and the essential oil was evaluated by agar diffusion assay against seven microbial strains, four bacteria and three fungi. The result shown that methanolic extracts have no effect. Whereas, EO shown a strong antifungal and a moderate antibacterial activity.

Key word: Secondary metabolites, *Mentha rotundifolia*, antioxidant activity, antimicrobial activity.

الملخص

تهتم العديد من البحوث العلمية حاليا بدراسة الفوائد الحيوية للجزيئات الطبيعية. تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط المضاد للأوكسدة و المضاد للمكروبات لمستخلصين بالميثانول تم الحصول عليهما بواسطة النقع و جهاز Soxhlet على التوالي و للزيت الأساسي المستخلص بالتقطير المائي للأجزاء الهوائية لنبتة *Mentha rotundifolia*. قدر مردود الاستخلاص ب: 16.05 % (ك/ك)، 9.2 % (ك/ك) و 0.7% (ح/ك) على التوالي. سمح الفحص الكميائي- النباتي بإظهار فلافونويدات، دباغ، عديدات الفينول و تربنويدات في المستخلصين الميثانوليين. قدرت عديدات الفينول الكلية بواسطة متفاعل-Folin-Ciocalteu حيث وجد 0.143 ± 141.57 (م م بواسطة النقع) ، 1.642 ± 168.642 (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ مستخلص . قدرت الفلافونويدات بطريقة AlCl_3 فكانت النتائج 0.030 ± 15.636 (م م بواسطة النقع)، 0.76 ± 33.045 ميكروغرام (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ كارستين/ملغ مستخلص. كما قدر محتوى الفلافونولات و الفلافونات ب 1.357 ± 42.6 (م م بواسطة النقع) ، 0.214 ± 47.071 (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ كارستين/ ملغ مستخلص. سمح تحليل الزيت الأساسي ب: GC و GC/MS بالتعرف على 43 مركب يتصدرها Oxyde de pépéritène. قدر النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلصات باستعمال عدة اختبارات مختلفة، في حالة اختبار DPPH، كان التركيز المثبط ل 50% في حدود 2.221 ± 265.491 ميكروغرام/مل، 133.160 ± 11.346 ميكروغرام / مل 0.006 ± 1755 بالنسبة للمستخلصين الميثانوليين بواسطة النقع و Soxhlet و الزيت الأساسي على التوالي. أظهرت النتائج بالنسبة لاختبار استخلاص الأيونات أن المستخلصين الميثانوليين فقط لهما قدرة استخلاصية حيث قدرت قيم CE_{50} ب 0.011 ± 3.417 ملغ/مل، 0.038 ± 2.194 ملغ/مل . إضافة إلى ذلك تملك المستخلصات قدرة مرجعة بقيم CE_{50} : 3.613 ± 550.325 ميكروغرام/مل، 1 ± 468 ميكروغرام/مل، 0.004 ± 1625 ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلصين الميثانوليين بواسطة النقع و Soxhlet و الزيت الأساسي على التوالي. تم في هذه الدراسة أيضا تقييم النشاط المضاد للمكروبات، بينت النتائج أن المستخلصين الميثانوليين لا يملكان أي تأثير مضاد للمكروبات، بينما يملك الزيت الأساسي نشاط ضد ميكروبي متوسط ضد البكتيريا و عالي ضد الفطريات.

الكلمات المفتاحية: المستقلبات الثانوية، *Mentha rotundifolia*، النشاطية المضادة للأوكسدة، النشاطية المضادة للمكروبات.

Sommaire

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

Partie bibliographique

Chapitre I

La plante *Mentha rotundifolia*

1. Propriétés botaniques.....	3
1.1. Morphologie.....	3
1.2. Systématique de la plante	5
1.3. Répartition.....	5
1.4. Nomenclature.....	5
2. Vertus médicinales.....	5
3. Phytochimie	6

Chapitre II

Les métabolites secondaires

1. Généralité.....	7
2. Les huiles essentielles.....	7
2.1. Localisation des huiles essentielles dans les tissus.....	7
2.2. Composition chimique	8
2.3. Utilisation des huiles essentielles.....	11
3. Les polyphénols	11
3.1. Les acides phénoliques	11
3.2. Les flavonoïdes	12
3.3. Les tanins.....	15
3.4. Quelques activités des polyphénols.....	16
3.5. La biodisponibilité des polyphénols	16

Chapitre III

Les activités biologiques

1. L'activité antioxydante.....	18
1.1. Le stress oxydant	18
1.2. Les radicaux libres.....	18
1.3. Les effets et les conséquences biochimiques du stress oxydant.....	22
1.4. Implications pathologiques des espèces réactives	23
1.5. Les antioxydants.....	24
2. L'activité antimicrobienne.....	27
2.1. Les infections microbiennes	27

2.2. Les antibiotiques.....	27
2.3. Mode d'action des antibiotiques.....	28
2.4. Relation structure- activité des polyphénols.....	29
2.5. Mode d'action des huiles essentielles.....	29
2.6. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	29
2.7. Souches bactériennes utilisés dans la présente étude.....	29

Partie expérimentale
Chapitre IV
MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.....	32
2. Méthodes.....	34
2.1. Préparation des extraits.....	34
2.2. Screening phytochimique.....	34
2.3. Analyse quantitative des extraits méthanoliques.....	36
2.4. Analyse des huiles essentielles.....	37
2.5. Activité antioxydante.....	38
2.5. Activité antimicrobiennes.....	41

Chapitre V
Résultats et discussion

1. Résultats.....	43
1.1. Rendement des extractions	43
1.2. Le screening phytochimique	43
1.3. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols.....	45
1.4. Composition chimique de l'huile essentielle.....	47
1.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	49
1.6. Activité antimicrobienne.....	54
2. Discussion.....	60
Conclusion.....	71
Références bibliographiques.....	72
Annexe.....	87

Liste des abréviations

Abs: Absorbance.

ATCC: American type culture collection

BHA: Butylated hydroxyanisole

CI₅₀: Concentration inhibitrice 50 %.

DMSO: Dimethylsulfoxyde.

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAG: Equivalent en acide galique.

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid

HE: Huile essentielle

EMM: Extrait méthanolique obtenu par macération

EMS: Extrait méthanolique au Soxhlet

ERN: Espèces réactives d'azote

ERO: Espèces réactives d'oxygène

EQ: Equivalent en quercétine.

m/m: Masse par masse.

NRRL: Northern Regional Research Laboratory

PDA: Pomme de terre dextrose agar

R²: Coefficient de corrélation.

UV: Ultraviolet.

w/w: Weight / Weight

Liste des figures

Fig. 1: La plante <i>Mentha rotundifolia</i>	04
Fig. 2: Structures chimiques des constituants majoritaires de l'HE de <i>M. rotundifolia</i> ...	06
Fig. 3: Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles.....	09
Fig. 4: Les principaux acides phénoliques.....	12
Fig. 5: Structure de base des flavonoïdes.....	13
Fig. 6: Liens indiquant l'effet des flavonoïdes sur les différentes maladies.....	15
Fig. 7: Exemples de structures de tanins hydrolysables (1) et de tanins condensés (2)...	16
Fig. 8: La formation des espèces réactives lors des activités métaboliques cellulaires...	22
Fig. 9 : La présentation chimique d'essai de piégeage des radicaux DPPH [*] in vitro.....	40
Fig. 10: Screening phytochimique des extraits méthanoliques de <i>M. rotundifolia</i>	46
Fig. 11: Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux..	48
Fig. 12: Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux	48
Fig. 13: Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols...	48
Fig. 14: Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	49
Fig. 15: Courbes tracées en fonction des concentrations croissantes des EMM (a), EMS (b) de l'HE (c) et de BHA (d) et le pourcentage d'inhibition du DPPH [*]	52
Fig.16: Activités antiradicalaires des extraits méthanoliques, de l'HE et de BHA.....	52
Fig. 17: Courbes tracées en fonction des concentrations croissantes d'EMM (a), d'EMS (b), EDTA (c) et des pourcentages de chélation du fer ferreux.....	53
Fig. 18: courbes tracée en fonction des concentrations croissantes des EMM (a), EMS (b) de l'HE (c) et de BHA (d) et le pouvoir réducteur.....	54
Fig. 19: Blanchissement du β -carotène- acide linoléique manifesté par les extraits de <i>M. rotundifolia</i> et les contrôles positifs et négatifs.....	55
Fig.20: Sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques et antifongiques...	58
Fig. 21: Effet de l'huile essentielle de la plante <i>Mentha rotundifolia</i> sur les souches microbiennes testées.....	61

Liste des tableaux

Tab. I: Structures chimiques de quelques flavonoïdes.....	14
Tab. II: Les espèces réactives d'oxygène et d'azote d'intérêt biologique.....	19
Tab. III: Principales affections liées au stress oxydant.....	24
Tab. IV: Les produits chimiques et les appareillages utilisés dans la présente étude....	34
Tab. V: Mise en évidence les différents groupes chimiques dans les extraits méthanoliques.....	46
Tab. VI: Teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en flavones et flavonols des extraits méthanoliques de <i>Mentha rotundifolia</i>	47
Tab. VII: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>M.rotundifolia</i>	49
Tab. VIII: Les concentrations effectrices à 50% (CE ₅₀) des extraits de la plante et d'EDTA.....	53
Tab.IX: Les CE ₅₀ des extraits de <i>M. mentha rotundifolia</i> et de BHA.....	54
Tab. X: Diamètre des zones d'inhibition en (mm) des différents microorganismes en présence de quelques antibiotiques.....	57
Tab. XI: Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de différentes dilutions de l'huile essentielle.....	59
Tab. XII: Les valeurs des zones d'inhibition équivalentes aux dilutions minimales inhibitrices.....	60

Annex

Composition des milieux de culture

➤ **Milieu MH**

Extrait de viande de bœuf: 2.0g ;

Peptone de caséine: 17.5g ;

Amidon de maïs: 1.5g ;

Agar: 17.0g

pH: 7.4.

➤ **MH agar additionné de sang (gélose au sang)**

Infusion de viande de bœuf déshydraté: 300 g

Hydrolysate de caséine:17.5 g

Amidon de maïs: 1.5 g

Sang de cheval lysé: 2 à 5%

Agar Agar: 13 g

Eau distillée: 1000 ml

➤ **Milieu PDA**

Extrait de pomme de terre: 1000ml

Dextrose: 20g

Agar: 20g

➤ **Sabouraud simple**

Peptone: 10 g

Gélose: 20 g

Glucose: 20 g

Eau distillée:1000 ml

➤ **Milieu Sabouraud + chloramphénicole**

Sabouraud simple + chloramphénicole 0.5g

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour le traitement de diverses maladies parce qu'elles contiennent des composants riches en principes thérapeutiques (Khaldi et *al.*, 2012). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) près de 80% de populations dépendent de la médecine traditionnelle. La plupart des plantes sont utilisées empiriquement et sans validation scientifique de leur efficacité et sécurité (Moutinho, 2013).

Il est connu que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN) peuvent être à la fois bénéfiques et nuisibles dans les systèmes biologiques. Les effets bénéfiques d'ERO sont évidents dans leur rôle physiologique dans de nombreuses réponses cellulaires. En revanche, à des concentrations élevées, les ERO peuvent être des médiateurs importants de dommages aux différents constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Cardenas-Rodriguez et *al.*, 2013). Par conséquent, ils peuvent être impliqués dans le développement de nombreuses maladies comme les maladies cardiovasculaires et pulmonaires, certains types de cancer, maladies immunitaires, l'inflammation et les cataractes (Qusti et *al.*, 2010).

Les maladies infectieuses sont la principale cause de mortalité dans le monde, ce qui représente près de la moitié de tous les décès dans les pays tropicaux de même elles deviennent un problème important dans les pays développés (Ullah et *al.*, 2011). Actuellement, la toxicité des antioxydants synthétiques et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques ont augmenté le risque des effets néfastes des radicaux libres et des microorganismes sur la santé humaine. A cet égard, les plantes peuvent fournir une bonne alternative à la recherche de nouveaux produits chimiques avec un large éventail d'activités. C'est pourquoi, le présent travail a été entrepris afin de mettre en exergue les vertus de *Mentha rotundifolia*, plante médicinale largement distribuée en Algérie.

Les objectifs de la présente étude sont:

- Préparation des extraits méthanoliques et extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de la plante *Mentha rotundifolia*.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en flavone et flavonols des extraits méthanoliques et caractérisation de l'HE.

- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle par les tests de DPPH, chélation du fer ferreux, le pouvoir réducteur et le test qualitatif du blanchissement du β -carotène.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* vis-à-vis de sept souches par la méthode de diffusion sur gélose.

1. Propriétés botaniques

La famille des Lamiacées englobe une grande variété de plantes aromatiques, distribuées principalement dans les pays à climat tempéré (Derwich *et al.*, 2011). Elle comprend environ 220 genres et plus de 4000 espèces (Arijit et Arpita, 2013), dont le genre *Mentha* avec ses 25 espèces (Rodrigues *et al.*, 2013). La classification taxonomique de ces espèces est très difficile (Denslow et Poindexter, 2009); en raison de la grande diversité dans leurs caractères morphologiques (Lorenzo *et al.*, 2002) et l'hybridation fréquente survenant dans les populations sauvages ou cultivées (Šaric-Kundalic *et al.*, 2009).

Les plantes appartenant à ce genre produisent plusieurs métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols, les terpènes et les quinones (Erum *et al.*, 2012). En raison de leurs propriétés utiles, ces plantes sont utilisées en industrie pharmaceutiques, alimentaire et cosmétique (Andro *et al.*, 2011).

1.1. Morphologie

M. rotundifolia est une herbe vivace de 25 à 80 cm de hauteur. Les feuilles sont distinctement pédonculées, ovales, obtuses, moins de 2 fois plus longues que larges, ridées en réseau. Inflorescences en épis en têtes ou en verticilles. Calice tubuleux ou en cloche à 5(4) dents subégales. Corolle infundibuliforme blanche, rosée ou violet pâle à 4 lobes subégaux. Les fleurs sont en épis cylindriques terminaux non feuillés. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher. Comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme (Fig. 1) (Benayad, 2008; Quezel et Santa, 1963).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figure. 1: la plante *Mentha rotundifolia* récoltée au mois d'octobre 2012, dans la région de Djemila, Willaya de Sétif. (A) parties aériennes, (B) fleurs, (C), (D) feuilles.

1.2. Systématique de la plante

Une ambiguïté subsiste dans la littérature sur l'identification de cette plante; certains auteurs affectent des noms différents pour la même espèce *M. suaveolens* et *M. rotundifolia* (Khanuja et al., 2000; Hendrik et Van Os, 1976). Cependant, cette dernière est considérée comme un hybride *M. longifolia* x *M. suaveolens* (Lawrence, 2007; Kothe, 2007).

D'après Quezel et Santa (1963), la classification de *Mentha rotundifolia* est la suivante:

Embranchement: Spermatophytes

Sous- embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Famille: Lamiaceae

Genre: *Mentha*

Espèce: *Mentha rotundifolia*.

1.3. Répartition

M. rotundifolia croît dans les zones humides près des cours d'eau en basse et moyenne montagne (El Arch et al., 2003). Elle pousse sous les bioclimats semi-arides et humides à variantes chaudes et tempérées au tour du bassin méditerranéen, en Amérique et en Asie occidentale (Derwiche et al., 2010).

1.4. Nomenclature

M. rotundifolia connue par les population locale « Megne essif» porte différentes dénominations à savoir «timarssat» en Algérie (Khadraoui et al., 2013), «Timija» ou «la menthe en épi» au Maroc (El Arch et al., 2003), «Applemint» (Umamoto, 1998), «Baume sauvage»,«Ment astre», «menthe douce à feuilles ronde» (Kothe, 2007).

2. Vertus médicinales

Dans certaines régions du monde, cette menthe est utilisée dans les préparations culinaires (comme condiment) et en médecine traditionnelle pour un large éventail d'actions: tonique, stimulante, stomachique, carminative, analgésique, antispasmodique, anti-inflammatoire, hypotensive et

insecticides (Ladjel et *al.*, 2011), mais elle ne doit pas être utilisée au cours de la grossesse (Kothe, 2007).

3. Phytochimie

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de *Mentha rotundifolia*, dont les plus importants sont décrits dans les huiles essentielles. Ces huiles présentent une diversité chimique en relation avec la distribution géographique: Maroc (Derwich et *al.*, 2010), Uruguay (Lorenzo et *al.*; 2002), Cuba (Pino et *al.*, 1999), Japon (Shimizu, 1956).

Souvent les HE de cette espèce sont dominées par les monoterpène oxygéné comme l'oxyde de pipéritène, pipéritène, pipéritone (Fig. 2).

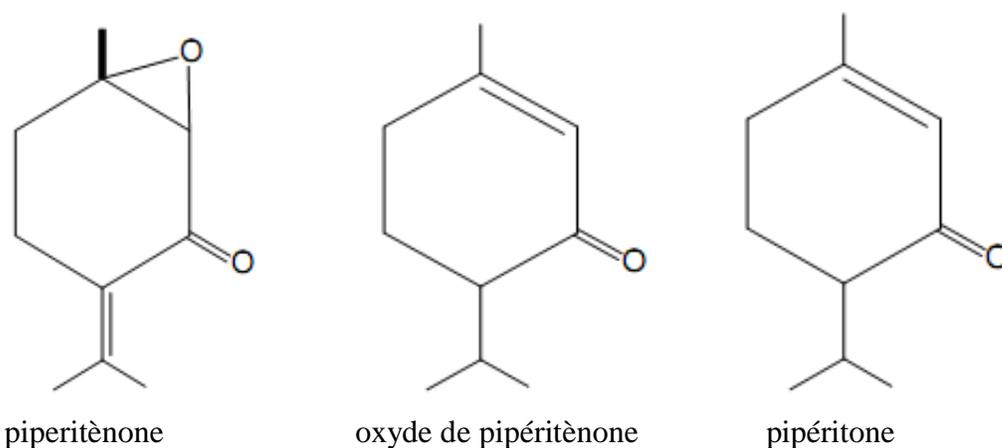


Figure. 2: Structures chimiques des principaux constituants de l'HE de *M. rotundifolia* (Lawrence, 2007).

Les métabolites secondaires

1. Généralités

Ce sont des substances naturelles produites en faible quantité dans les plantes (Ali et *al.*, 2013) et les microorganismes comme les bactéries et les champignons (Troppens et *al.*, 2013). A l'inverse des métabolites primaires; les métabolites secondaires sont des espèces spécifiques qui ne sont pas directement impliquées dans le cycle de vie normal des plantes (Lee et *al.*, 2013), mais les végétaux supérieurs ont la capacité de les synthétiser pour diverses fonctions adaptatives (Wink, 2013). Notamment, en réponse au stress biotique et abiotique qu'ils peuvent subir tels que les changements de températures, la sécheresse, la salinité, la radiation, les herbivores, les infections pathogènes, la défense contre l'attaque des organismes compétitifs dont les bactéries, les champignons, les insectes, les animaux et les autres plantes (Kliebenstein., 2012; Costa et *al.*, 2013). Cependant, le rôle écologique le plus important des métabolites secondaires des plantes est lié à la fonction reproductrice qui garantit le succès évolutif de toutes les espèces vivantes, les pigments et les composés volatils de ces métabolites peuvent attirer les pollinisateurs et ainsi favoriser la dispersion des graines et la fécondation (Iriti, 2013).

Ces composés sont importants, non seulement en raison de leur rôle dans les plantes, mais aussi pour leurs propriétés biologiques comme antioxydant, antimicrobien et anti-cancérogènes et leurs effets thérapeutiques contre plusieurs maladies à savoir l'hypertension, le diabète et l'obésité (Aires et *al.*, 2013).

2. Les huiles essentielles

Une HE est une substance odorante et volatile, non grasse, extraite d'un végétal sous forme liquide. L'HE a une composition moléculaire complexe, lui confère des vertus uniques. Elle ne contient ni protéines, ni lipides, ni glucides, ne contient pas de minéraux ni de vitamines ; Elle n'a donc aucune valeur nutritionnelle (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

2.1. Distribution tissulaire des huiles essentielles

Elles proviennent d'une sécrétion élaborée par certains végétaux et contenues dans des structures spécialisées (poils, poches et canaux sécréteurs) (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur

des pétales de rose). Mais, généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (Benayad, 2008).

Les herbes aromatiques de la famille Lamiacées possèdent deux types de trichomes glandulaires sur la surface de leurs feuilles qui sont peltatés et capitatés (Zizovic et *al.*, 2005; Belhattab et *al.*, 2006).

2.2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants, elles contiennent 20 à 60 composants avec des concentrations différentes et sont caractérisées, généralement, par deux ou trois composants majoritaires représentant 20 à 70 % de l'huile essentielle totale, alors que les autres composés se trouvent sous forme des traces. Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux principaux groupes: les terpènes et les composés aromatiques (Fig. 3) (Bakkali et *al.*, 2008).

2.2.1. Les terpénoïdes

L'enchaînement de molécules isopréniques (5 atomes de carbones) conduit à la formation de plus de 20000 molécules terpéniques différents, celui-ci sont classées en monoterpènes (deux unités d'isoprène), triterpènes (six unités d'isoprène)...etc. En outre, des fragments terpéniques peuvent être rattachés à des molécules produites par des voies de biosynthèse non terpéniques formant des produits connus comme les isoprénoïdes hybrides (Gallagher et *al.*, 2010; Tholl, 2006).

Les unités isopréniques peuvent être synthétisées dans les plante supérieures au niveau de cytoplasme ou la mitochondries, via la voie du mévalonate et au niveau des plastides via la voie de déoxyxylulose phosphate (Eisenreich et *al.*, 2001).

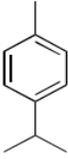
Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire, ceux dans la masse moléculaire n'est pas trop élevée: mono et sesquiterpènes (Bruneton, 1995). Sous forme de métabolites secondaires, les terpènes sont fréquents dans les plantes, les insectes, les champignons et certains invertébrés marins tels que les coraux mous. Ce type de métabolites peut jouer un rôle important dans la signalisation écologique et la défense chimique et sont responsables de la plupart des odeurs et des saveurs des plantes (Gallagher et *al.*, 2010).

1. Terpènes

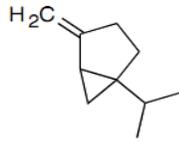
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("y") or p.cymene

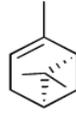


Sabinene

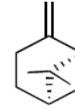


Carbure bicyclic

Alpha-pinene

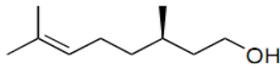


Betapinene

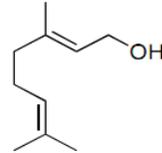


Alcohol acyclic

Citronellol

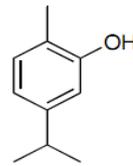


Geraniol

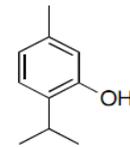


Phenol

Carvacrol



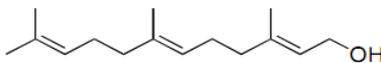
Thymol



-Sesquiterpenes

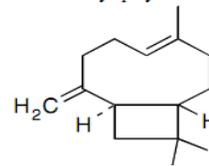
Carbure

Farnesol



Alcohol

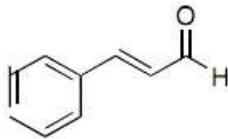
Caryophyllene



2. Composés aromatiques

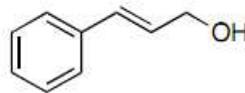
Aldehyde

Cinnamaldehyde



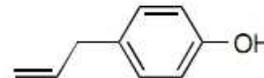
Alcohol

Cinnamyl alcohol



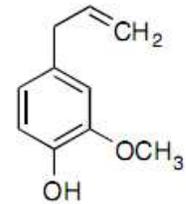
Phenol

Chavicol



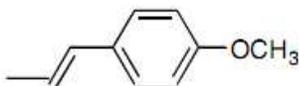
Phenol

Eugenol



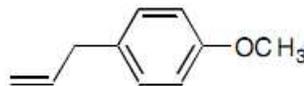
Methoxy derivative

Anethole



Methoxy derivative

Estragole



Methylene dioxy compound

Safrole

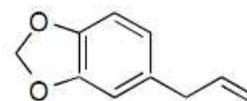


Figure. 3: Structure chimique de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles (Bakkali et al., 2008).

a. Les monoterpènes

Sont les plus simples constituants de terpènes, dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) (Bakkali et *al.*, 2008). Chez l'homme, les monoterpènes sont principalement métabolisés par le cytochrome P450, monooxygénases, les époxydes hydrolases et les dehydrogénases en des composés mono et dihydroxylés, ces derniers sont plus oxydés et sont conjugués essentiellement avec l'acide glucuronique (Schmidt et *al.*, 2013).

b. Les sesquiterpènes

Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans les monoterpènes, elles comprennent des carbures mono ou polycycliques (β -bisabolène, β -caryophyllène et longifolène), des alcools (farnésol, carotol, β -santalol et patchoulol), des cétones (nootkatone, cis-longipinane-2, 7-dione et β -vétivone), des aldéhydes (sinensals) et des esters (acétate de cédryle) (Bruneton, 1995).

2.2.2. Les composées aromatiques

Les composés aromatiques sont des dérivés de phenylpropane (C_6-C_3) et sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Ils peuvent contenir des aldéhydes comme le cinnamaldehyde, des alcools comme alcool cinnamique, des phénols comme chavicol et eugenol, des dérivés méthoxy comme l'anethol, elemicine et des dérivés dioxyméthylène comme l'apiole, myristicine et safrole (Bakkali et *al.*, 2008) (voir Fig.3).

2.2.3. Autres composés

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînable lors de l'hydrodistillation. Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaires plus importantes: homologue de phynylpropane, ditèrène, coumarines... (Brunton, 1995).

2.3. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues par leur utilisation dans plusieurs domaines; en médecine pour le traitement de diverses maladies comme les rhumatismes, la fièvre, le diabète, de même, elles ont un effet antioxydant, antifongique, insecticide et nématocides. En industrie, elles sont utilisées comme des arômes pour l'amélioration de la saveur et pour empêcher l'oxydation des aliments (kim *et al.*, 2013; Ekren *et al.*, 2013)

3. Les polyphénols

Les polyphénols sont un groupe important de composés produits par de nombreuses plantes (Bakhouché *et al.*, 2013). Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les rayons ultraviolets, les agents pathogènes et les herbivores (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010). La qualité et la quantité des polyphénols dans les plantes peuvent varier considérablement en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que le génotype des plantes, la composition du sol, le degré de maturité et l'état des cultures (Faller et Fialho, 2010).

Les polyphénols comprennent une grande variété de molécules avec plusieurs groupement hydroxyles sur leurs cycles aromatiques. Ils comportent également des molécules avec un seul cycle phénolique, tels que les acides phénoliques et les alcools phénoliques. Ils sont divisés en plusieurs classes, en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et les fonctions chimiques liées à ces cycles (Pérez-Pérez *et al.*, 2013) à savoir: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines (Luthria *et al.*, 2006).

3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont un groupe de métabolites secondaires largement distribués dans les plantes (Chen *et al.*, 2012) essentiellement dans les légumes, les fruits, les céréales et les plantes médicinales (Holle *et al.*, 2012). Ils sont nécessaires pour les fonctions normales des plantes, où ils

jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux agents pathogènes et les herbivores, la croissance des plantes, la couleur et les caractéristiques organoleptiques des plantes et la prévention du stress oxydatif (Kawsar et *al.*, 2008; Challacombe et *al.*, 2012).

Ils sont produits sous forme d'esters, glycosides ou amides, mais rarement sous forme libre. La variation des acides phénoliques est dans le nombre et l'emplacement de groupes hydroxyle sur le cycle aromatique. Ils ont deux structures principales (Fig. 4): acide hydroxycinnamique (dérivés hydroxylés de l'acide cinnamique) et acide hydroxybenzoïque (dérivés hydroxylé de l'acide benzoïque) (Khoddami et *al.*, 2013).

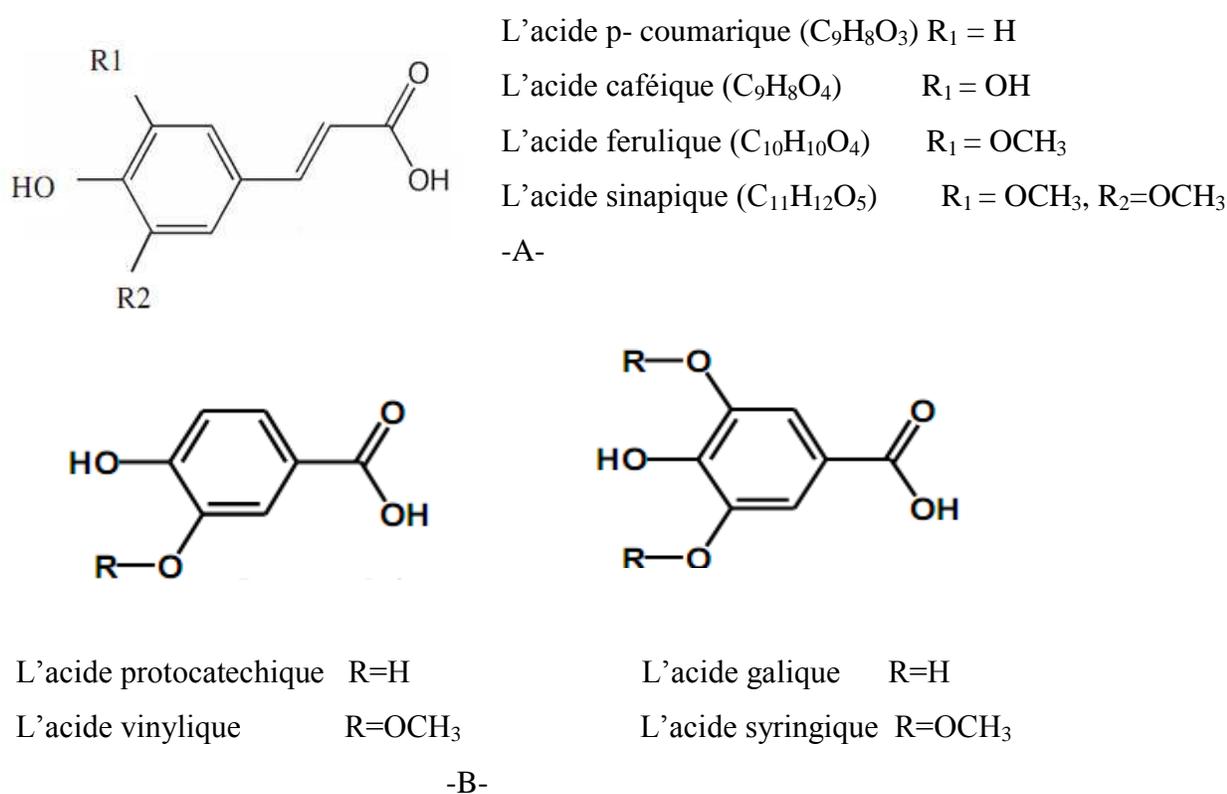


Figure. 4: Structure chimique des principaux acides phénoliques: A- Acides hydroxycinnamiques, B- Acides hydroxybenzoïques (Tsao, 2010; McCarthy et *al.*, 2013).

3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe important de composés phénoliques dans les plantes supérieures (Dóka et *al.*, 2011). Ils comprennent plus de 6500 molécules et possèdent un squelette de 15 atomes de carbones (Fig. 5) (Chae et *al.*, 2013). Ils sont synthétisés dans les plantes

supérieures par les voies de l'acide shikimique et l'acide malonique (Balasuriya et Rupasinghe; 2011).

Les différences de structures de ces composés résultent de réactions d'hydroxylation, alcalinisation et glycosylation qui modifient la molécule de base (Khoddami et *al.*, 2013). Les flavonoïdes sont subdivisées en six sous-groupes (Tab. I): les flavanones, les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les anthocyanes et les isoflavones (Balasuriya et Rupasinghe, 2011). Six autres sous- groupes à savoir flavanes, isoflavanones, isoflavanes, chalcones, aurones et coumarines ont été aussi classés parmi les flavonoïdes (Jash et Brahmachari, 2013).

Au sein d'une même sous-classe, des autres différences sont basées sur le nombre et la nature des substituants liées aux cycles (Plazonić et *al.*, 2009).

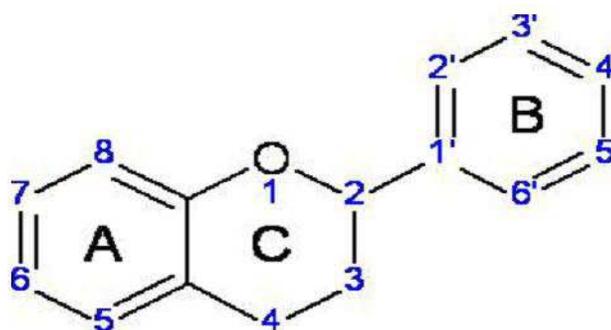


Figure. 5: Structure de base des flavonoïdes (Bojić, 2011).

Tab. I: Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Kay *et al.*, 2012; Tsao, 2010).

Sous classe	Structure	Exemples	R ₁	R ₂	R ₃
Flavanones		Naringenine	H	OH	H
		Eriodictyole	OH	OH	H
		Hesperetine	OH	O- CH ₃	H
Flavonols		Kaempferole	HO	H	H
		Quercetine	OH	OH	H
		Myricetine	OH	OH	OH
Flavones		Apigenine	H	OH	H
		Luteoline	OH	OH	H
		Chrysoeriole	O-CH ₃	OH	H
Flavan-3-ols		Epicatechine	OH	OH	H
		Epicatechine gallate	OH	OH	H
		Epigallocatec- hine gallate	OH	OH	OH
Anthocyanin anthocyanidin		Cyanidine	OH	OH	H
		Petunidine	O-CH ₃	OH	OH
		Delphinidine	OH	OH	OH
Isoflavones		Genisteine	OH	H	H
		Biochanine	OH	H	OCH ₃
		Daidzeine	H	H	H

➤ Activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent produits dans les tissus végétaux dans des conditions de stress comme la lumière d'intensité élevée, la basse température, la carence en éléments nutritifs et l'attaque d'un pathogène ou de la sénescence (Gutha et *al.*, 2010). Dans les plantes; ils sont responsables de la couleur, la saveur et l'arôme des fruits et des fleurs (Wojakowska et *al.*, 2013) et sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et biochimique des plantes tels que la protection contre les UV, l'attraction des insectes, la défense contre les herbivores et la symbiose (Brunetti et *al.*, 2013). Dans les cellules eucaryotes, les flavonoïdes assurent une multitude de fonctions (Fig. 6). Il sont doués d'activité antimicrobienne, anticancéreuse, antivirale, anti-leishmaniose, radioprotection (Xie et *al.*, 2013) antiallergique, anti-inflammatoire, antidiabétique, antioxydante (Dong Woo et Kim, 2013). Les flavonoïdes sont généralement non toxiques (Ren et *al.*, 2003).

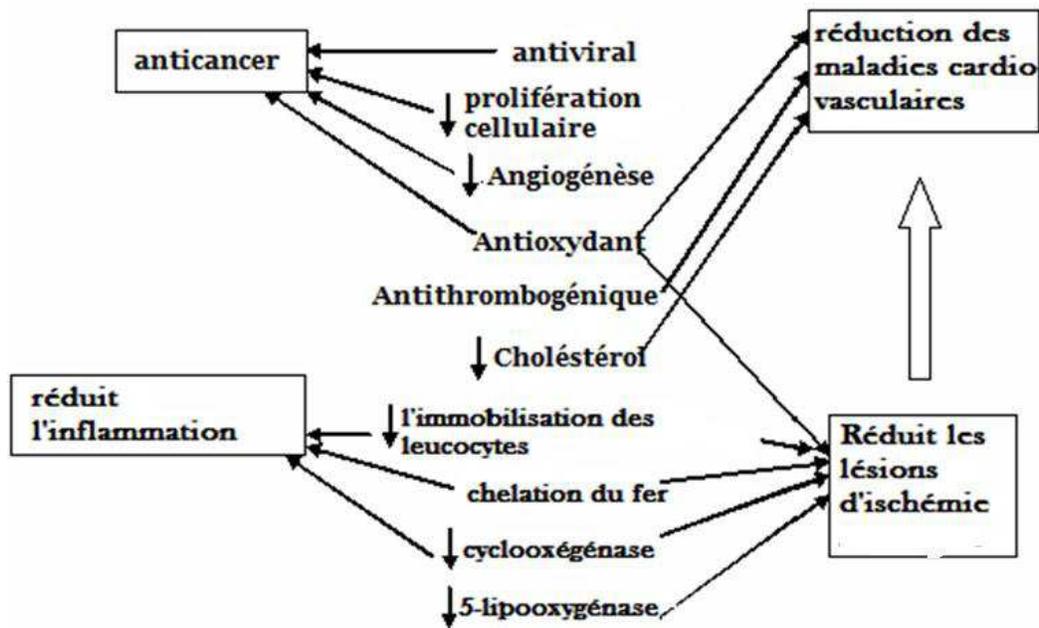
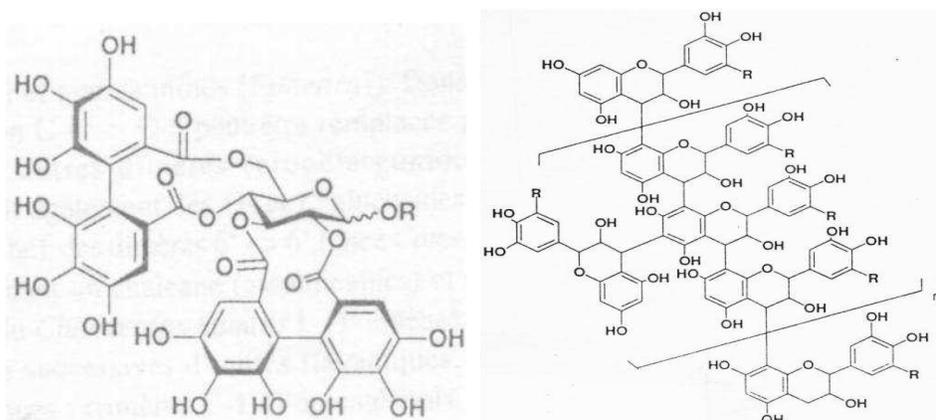


Figure. 6: Liens indiquant l'effet des flavonoïdes sur les différentes maladies (Tapas et *al.*, 2008).

3.3. Les tanins

Les tanins végétaux sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires entre 500 et 3000. Ils sont aptes à la préparation du cuir et donnent les réactions classiques des phénols. En outre, ils ont l'aptitude à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Sereme et *al.*, 2010).

Dans le passé, les tanins ont été classés en deux groupes pyrogallol et catéchol. Actuellement, les tanins ont classé en tanins hydrolysables et non hydrolysable ou condensés (Fig. 7) (Okuda et Ito, 2011; Adamczyk et *al.*, 2013).



(1) Pédunculagine (R = H)

(2) Polymère proanthocyanidolique

Figure. 7: Structures chimiques d'un tanin hydrolysables (1) et d'un tanin condensés (2) (Sereme et *al.*, 2010).

3.4. Quelques activités des polyphénols

Les mécanismes généraux d'action des polyphénols peuvent être identifiés, néanmoins chaque polyphénol peut exercer un rôle physiologique différent, selon sa constitution chimique, disponibilité biologique et métabolisme (Savini et *al.*, 2013).

Les polyphénols possèdent de multiples propriétés biologiques tels que l'effet antioxydant, antimicrobien, anti-thrombotique, anti-allergique, anti-inflammatoire (Arribas et *al.*, 2013) anti-ulcéreux, anti-carcinogène et anti-mutagène (Nawaze et *al.*, 2006). Les polyphénols ont également des propriétés contre les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, divers types de cancer et le diabète (Abdulla et *al.*, 2013; Krook et *al.*, 2012).

3.5. La biodisponibilité des polyphénols

Les polyphénols sont connus par leur activité antioxydante *in vitro*, mais *in vivo*, leur activité reste non confirmé (Yeddes et *al.*, 2013).

Il y a plusieurs preuves suggérant que les composés phénoliques sont rapidement métabolisés dans l'organisme humain (Heleno et *al.*, 2013). Leur métabolisme se fait par une voie commune; les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle. Cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme d'esters, glycosides, ou des polymères qui ne peuvent être absorbés dans leur forme native. Ces substances doivent être hydrolysées par les enzymes intestinales ou par la microflore avant qu'ils puissent être absorbés. Au cours de l'absorption, les polyphénols se conjuguent dans l'intestin grêle et plus tard dans le foie, ce processus comprend principalement la méthylation, sulfatation et glucuronidation. Cette conjugaison permet d'augmenter le caractère hydrophile des polyphénols et facilite leur élimination.

Dans le sang, les polyphénols sont liés à l'albumine. Ils sont excrétés par la voie biliaire dans le duodénum et dans les segments distaux de l'intestin, où ils sont soumis à l'action des enzymes bactériennes en particulier la glucuronidase. Ce cycle entéro-hépatique peut conduire à la réabsorption et une présence plus longue des polyphénols dans le corps (Manach et *al.*, 2004).

La concentration maximale des composés phénoliques dans le plasma dépasse rarement 1 μM ; après consommation de 50 mg d'un composé phénolique unique. Jusqu'à présent, il n'existe aucune preuve convaincante confirme l'accumulation à long terme des métabolites solubles dans l'eau, même lorsque des doses élevées de polyphénols sont consommés à plusieurs reprises (Milenkovic et *al.*, 2013).

1. Activité antioxydante

1.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants (Meda et *al.*, 2013), que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes antioxydantes (Albayrak et *al.*, 2013) ou une surproduction des radicaux libres (Duran- bedolla et *al.*, 2013).

1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont connus dans la chimie depuis le début du 20^{ème} siècle. Ils ont été initialement utilisés pour décrire des composés intermédiaires en chimie organique et inorganique (Rochette et *al.*, 2013). Ce sont des molécules ou fragment de molécules très réactives, puisque ils contiennent des électrons non appariés dans leur orbite extérieure (Penna et *al.*, 2009), ils cherchent donc à atteindre un état stable en s'appropriant les électrons des molécules proches qui à leur tour deviennent instables (Tab. II) (Capasso, 2013).

1.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants (Grassi et *al.*, 2010). Ce sont des molécules très réactives qui sont constamment produites par des réactions enzymatiques dans les cellules (Pérez-Pérez et *al.*, 2013). Il existe plusieurs ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) (Ivanov et *al.*, 2013).

1.2.2. Les radicaux dérivés d'azote (ERN)

Contrairement aux ERO, il y a peu de données sur l'altération induite par les espèces réactives d'azote (Kocsy et *al.*, 2013), ils sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres qui sont générés par la réaction de l'oxygène avec l'azote (Penna et *al.*, 2009).

Les ERN incluent des espèces non-radicalaires (acide nitreux, le peroxyde nitrite et alkylperoxyde nitrite) et des espèces radicalaires (l'oxyde nitrique et le dioxyde d'azote).

Tab. II: les espèces réactives d'oxygène et de nitrogène d'intérêt biologique (Devasagayam et *al.*, 2004).

L'espèce réactive	Symbole	Demi-vie biologique (seconde)
Les espèces réactives de l'oxygène		
anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6} s
radical hydroxyle	OH^{\cdot}	10^{-9} s
peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	stable
radical peroxyde	ROO^{\cdot}	seconde
hydroperoxyde	$ROOH$	stable
oxygène singulet	1O_2	10^{-6} s
ozone	O_3	seconde
Les espèces réactives d'azote		
oxyde nitrique	NO^{\cdot}	seconde
peroxynitrite	$ONOO^-$	10^{-3} s
acide peroxynitrique	$ONOOH$	stable
dioxyde de nitrogen	NO_2	seconde

1.2.3. Rôle physiologique des espèces réactives

Les ERO et les ERN sont produits dans toutes les cellules et jouent des rôles importants dans la physiologie des cellules tels que le déclenchement des réponses antioxydante, la migration (Bedolla et *al.*, 2013), la prolifération cellulaire normale, le métabolisme, l'expression de gènes, la mort cellulaire programmée, la sénescence (Fransen et *al.*, 2012), la différenciation cellulaire, l'immunité et la défense contre les microorganismes (Roberts et Sindhu, 2009).

De même, l'oxyde nitrique est un signal important dans divers événements physiologique dans les plantes comme la germination, le développement des racines, la fermeture des stomates, la floraison, la formation des nodules, la sénescence des feuilles, la mort cellulaire et la défense des plantes contre le stress abiotiques et biotiques (Kocsy et *al.*, 2013).

1.2.4. Sources des espèces réactives

a. Les sources endogènes

➤ La mitochondrie à partir de la chaîne respiratoire durant le transfert des électrons (DeMarchi et al., 2013). La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau. Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser «fuir» une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement (Gardès-Albert et al., 2003). 1 à 3% des électrons fuient au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire pour former l' O_2^- (Valko et al., 2007), ce dernier est considéré comme la source de nombreux radicaux (peroxyde d'hydrogène, oxygène singulier et radical hydroxyle...) (Kuka et al., 2012).

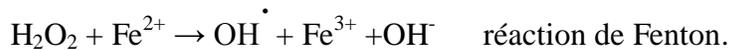
La production massive des ERO dans la mitochondrie augmente au cours du vieillissement cellulaire, puisque la fonction de la mitochondrie est altérée et l'intégrité de la membrane endommagée (Kohen et Nyska, 2002).

➤ Les peroxysomes sont des organites intracellulaires délimités par une membrane unique et dépourvu d'ADN (del Río, 2011). Les peroxysomes de mammifères jouent un rôle important dans plusieurs voies métaboliques, y compris, le métabolisme des acides gras (α -et β -oxydation), le métabolisme de glyoxylate, catabolisme des acides aminés, l'oxydation des polyamines et la voie des pentoses phosphates. La plupart des enzymes qui participent à ces voies génèrent des ERO ou ERN spécifiques comme sous-produits de leur fonction catalytique normale (Fransen et al., 2012).

➤ Les globules blancs, dont les neutrophiles, éosinophiles, les basophiles, les monocytes et les lymphocytes, sont des producteurs importants des ERO endogènes au cours de leur attaque contre les bactéries et les autres envahisseurs (Kohen et Nyska, 2002).

➤ Il y a quelques preuves que les tissus qui sont temporairement privés de leur approvisionnement du sang peuvent attirer une cascade de réactions menant à la production des radicaux libres (Lamina et al., 2013).

➤ Les réactions de Fenton et de Haber-Weiss peuvent être considérées comme source de la génération d' OH^\bullet à partir de H_2O_2 . La réaction de Fenton peut aussi s'effectuer par des métaux autres que Fe^{2+} comme Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} (Höhn et al., 2013).



- Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO au cours des réactions biochimiques dans les cellules. On peut les diviser en trois groupes: celles actives constitutionnellement, celles dont l'expression est induite en conditions pathologiques et celles qui sont importées au niveau vasculaire par les cellules migratrices (monocytes, macrophages). On retrouve dans le premier groupe les cyclo-oxygénases-1, les lipoxygénases, le cytochrome P450, la xanthine oxydase et la NAD(P)H oxydase, la NO synthase endothéliale. Les enzymes du deuxième groupe sont la thromboxane synthase, la cyclo-oxygénases- 2 et la NO synthase inductible dont les activités sont augmentées en conditions physiopathologiques. Enfin, les enzymes macrophagiques telles que la NAD(P)H oxydase leucocytaire et la myéloperoxydase constituent le troisième groupe (Beaudeau et *al.*, 2006).

b. Les sources exogènes des espèces réactives

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent être impliqués dans la production des espèces réactives tels que tabac, alcool, pollution, toxines exogènes, ozone, métaux toxiques (Bargagli et *al.*, 2009; Ahmed et *al.*, 2013).

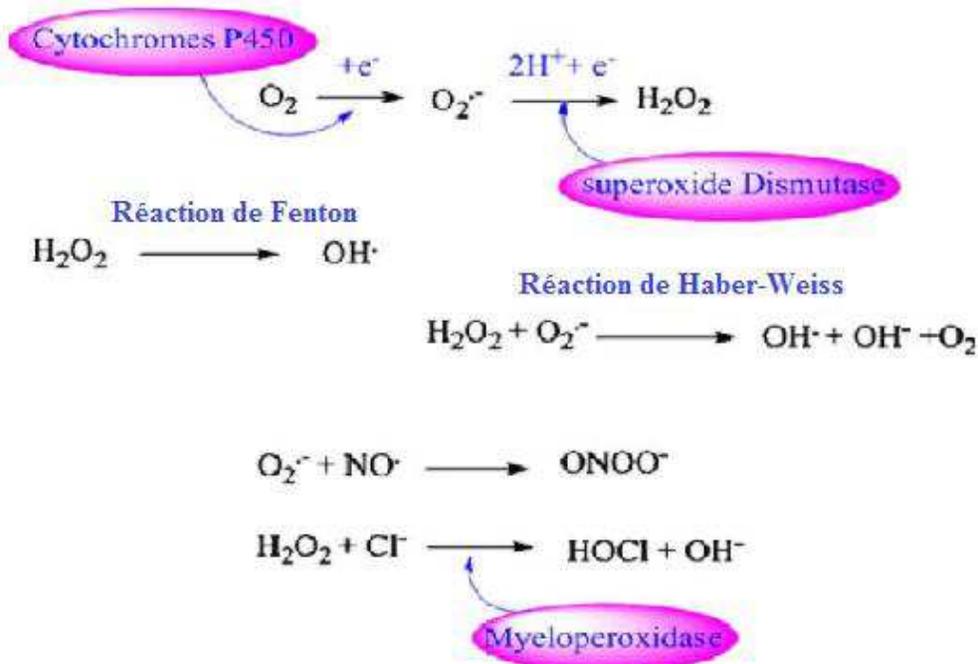


Figure. 8: la Formation des différentes espèces réactives lors des activités métaboliques cellulaires (Jena, 2012).

1.3. Les effets et les conséquences biochimiques du stress oxydant

Il s'agit des modifications des macromolécules cellulaires comme les lipides, les membranes, les protéines et les acides nucléiques. Ces altérations peuvent modifier les fonction des cellules et conduire à la mort cellulaire (Ma et *al.*, 2013).

➤ *L'action sur l'ADN*

L'ADN est constamment attaqué par des espèces réactives qui peuvent affecter sévèrement sa structure et sa fonction. Les modifications structurales de l'ADN résultent essentiellement à des modifications de ses bases, la coupure des brins d'ADN et l'altération de nombreuses protéines qui sont en contact avec l'ADN (Jena; 2012). Ces modifications peuvent conduire à des mutations génétiques affectant les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs (Borrego et *al.*, 2013).

➤ *L'action sur les protéines*

Les protéines sont facilement attaquées par les ERO et les ERN (Xiang et *al.*, 2013), leur oxydation est définie comme une modification induite soit directement par les interactions avec les radicaux libres ou indirectement par la réaction avec des sous-produits secondaires du stress oxydatif. Les dommages protéiques causés par les radicaux libres impliquent plusieurs réactions chimiques comme l'oxydation des chaînes latérales d'acide aminé, fragmentation des chaînes de polypeptides et les changements de conformation des protéines. Ces modifications peuvent conduire à diverses conséquences fonctionnelles telles que l'inhibition des activités enzymatiques, une susceptibilité accrue à l'agglomération et la protéolyse, l'augmentation ou la diminution de l'absorption cellulaire (Shacter, 2000; Kuka et *al.*, 2012).

➤ *L'action sur les lipides*

Le stress oxydatif cause la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires quand les radicaux libres réagissent avec les constituants membranaire essentiellement les acides gras polyinsaturés et les LDL. Les interactions entre les ERO et les lipides se déroulent en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminassions (Ahmed et *al.*, 2013).

La peroxydation des lipides implique la destruction des lipides membranaires, des troubles métaboliques et inflammatoires, la formation et la propagation des radicaux lipidiques avec de nombreux effets délétères (Zhao et *al.*, 2013) comme le malondialdéhyde (MDA) qui est un produit caractéristique de ce processus (Rofi'i et *al.*, 2013).

1.5. Les antioxydants

1.5.1. Définition

Un antioxydant est défini comme toute substance qui lorsqu'elle est trouvée à des concentrations faibles par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat (Asgarpanah et Kazemivash, 2012)

1.5.2. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants peuvent protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces réactives comme suit:

- ❖ Inhibition de la formation des radicaux libres.
- ❖ Neutralisation des radicaux libres.
- ❖ Augmentation du système de défense du corps.
- ❖ Réparation des dommages résultants de radicaux libres (Lamina et *al.*, 2013; Liochev, 2013).

1.5.3. Types des antioxydants

Pour contrôler la production permanente des espèces réactives, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages de ces radicaux (Rajesh et *al.*, 2013). Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes ou proviennent de l'alimentation ou la médication et sont donc exogènes.

1.5.3.1. Les antioxydants endogènes

➤ Les antioxydants enzymatiques

Ce système comprend plusieurs éléments dont les plus connus sont: la superoxyde dismutase (*SOD*), la catalase, la glutathions peroxydase (*GPx*). A coté de ces enzymes principales, il se trouve:

Les peroxyredoxines (Prxs)

Ce sont des enzymes dimériques avec une masse moléculaire d'environ 23 kDa. Ils sont caractérisés par la présence de résidus de cystéine à leur centre catalytique et agissent en tant qu'antioxydants spécifiques. Ces protéines sont également impliquées dans la dégradation enzymatique de H_2O_2 , d'hydroperoxyde et d' $ONOO^-$.



La thioredoxine peut régénérer la forme réduite du Prx (Cardenas-Rodriguez et *al.*, 2013).



Les paraxonases

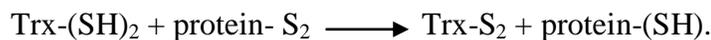
Récemment, la famille paraoxonase (PON) a émergé comme une nouvelle classe d'enzymes antioxydantes, jouant un rôle important dans les maladies associées à l'obésité, notamment les maladies cardiovasculaires et le diabète. Elle se trouve en particulier, à la surface des lipoprotéines de haute densité (HDL), PON₁ protège les lipoprotéines de basse densité (LDL) et des cellules circulantes contre les dommages oxydatifs, évitant ainsi les réactions inflammatoires dans les cellules de la paroi artérielle (Savini et *al.*, 2013).

L'hème oxygénase-1(HO-1)

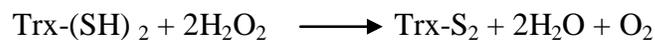
L'HO-1 joue un rôle important dans le métabolisme de l'hème, elle est considérée comme une enzyme antioxydante capable de réduire le stress oxydatif et inhiber l'inflammation. Des résultats récents indiquent que HO-1 joue un rôle bénéfique dans les maladies cardiovasculaires et dans la régulation du poids corporel et le métabolisme dans le diabète et l'obésité (Savini et *al.*, 2013).

Thioredoxin (Trx)

Cette enzyme avec un poids moléculaire de 12 kDa, est principalement trouvée dans le réticulum endoplasmique, sous la forme réduite. Elle contient deux groupes thiol (SH) qui peuvent être oxydés pour former le bisulfure (S₂ ou S-S):



Trx peut également réagir directement avec H₂O₂ (Cardenas-Rodriguez et *al.*, 2013).



➤ *Les antioxydants endogènes non enzymatiques*

Ce système comprend plusieurs molécules tels que le glutathion, l'acide urique et les protéines de stockage des métaux de transition (ferritine, transferrine, lactoferrine, céruloplasmine) (Savini et *al.*, 2013).

1.5.3.2. Les antioxydants exogènes

a. La vitamine E

C'est un terme qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α , β , γ , δ) ou tocols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. C'est l' α tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. Plus de 50% de la vitamine E se trouvent dans les tissus adipeux, le caractère hydrophobe de cette vitamine lui permet de s'insérer au sein des membranes biologiques riches en acides gras polyinsaturés, où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives (Papas, 2008; Yang et McClements, 2013).

b. La vitamine C

Elle est essentielle pour l'homme, car elle a plusieurs fonctions critiques comme un cofacteur enzymatique et un antioxydant (Kim et *al.*, 2013); en tant que cofacteur enzymatique, la vitamine C est impliquée dans la synthèse des catécholamines, du collagène, la synthèse de carnitine, la transformation de la dopamine en noradrénaline, le métabolisme des stéroïdes, de la tyrosine, du cholestérol et la formation de l'acide biliaire. Comme antioxydant, la vitamine C protège l'ADN, les protéines, les lipides, les enzymes et d'autres antioxydants par le piégeage des radicaux libres et la réduction des ions métalliques (Ge et *al.*, 2008; Pallauf et *al.*, 2013).

c. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH^\bullet et peroxydes RO^\bullet . Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Les caroténoïdes peuvent aussi capter l'oxygène singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets (Gardès-Albert et *al.*, 2003). Le β -carotène (provitamine A), le composant le plus efficace dans la famille des caroténoïdes; est une substance liposoluble susceptible d'être transformé en vitamine A dans le corps (Sanders et Emery, 2003).

e. Les polyphénols

Les polyphénols sont connus par leur activité antioxydante (Zhu et *al.*, 2012) qui est due à la présence d'un nombre important de groupements hydroxyles phénoliques (Hannan et *al.*, 2012). Les propriétés redox de ces composés leur permettent d'agir en tant qu'agents réducteurs, donateurs

d'hydrogène et éliminateurs de l'oxygène singulet. Certains montrent des propriétés chélatrices de métaux (Proestos et *al.*, 2013) et d'autres peuvent empêcher la production enzymatique des ERO telles que l'inhibition de cyclooxygénase, lipoxygénase et cytochrome P450 (Ferguson, 2001), de même, augmenter l'expression des enzymes qui ont une activité antioxydante telles que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase (Jayasena et *al.*, 2013).

f. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont utilisés dans l'industrie alimentaire afin d'éviter l'oxydation des lipides (Olmedo et *al.*, 2013) et de conserver les aliments pour le stockage et le transport prolongés (Olszewska et *al.*, 2010).

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le propylgallate (PG), le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) et tert-butyl-hydroquinone (TBHQ) et le gallate d'octyle (OG) (Niciforovic et *al.*, 2013; Hossain et *al.*, 2008). Ces antioxydants sont connus par leur effet néfaste à savoir le BHT et le BHA qui ont été soupçonnés d'être responsables de lésions du foie et de la carcinogénèse (Senevirathne et *al.*, 2006). TBHQ est interdit au Japon et certains pays Européens (Roby et *al.*, 2013).

2. L'activité antimicrobienne

2.1. Les infections microbiennes

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde; ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions de personnes dans le monde (Alwash et *al.*, 2013), l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques usuels, l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement et les immunodépressions causées par l'infection à VIH sont les principaux facteurs de la forte recrudescence de ces maladies (Bagre et *al.*, 2007).

2.2. Les antibiotiques

Il existe plus de 22 500 composés actifs biologiquement obtenus à partir des microorganismes, 45% proviennent des actinomycètes, 38% des champignons et 17% d'autres bactéries. Environ 5 000

antibiotiques ont été identifiés à partir des cultures de bactéries à Gram négatif, Gram positifs et les champignons filamenteux (Gebreyohannes et *al.*, 2013).

2.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent traiter les infections bactériennes par 4 modes d'action principaux:

- a. L'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire: carbapénèmes, vancomycine, β lactamines.
 - b. L'inhibition de la synthèse des protéines microbiennes:
 - Se lier avec la sous-unité 50S du ribosome: macrolides, le chloramphénicol, la clindamycine.
 - Se lier avec la sous-unité 30S du ribosome: aminoglycosides, tétracyclines.
 - Se lier avec l'enzyme bactérienne isoleucyl-ARN_t synthétase: chloramphenicol, tetracyclines.
 - c. L'interférence avec la synthèse des acides nucléiques:
 - Inhibition de la synthèse de l'ADN: fluoroquinolones.
 - Inhibition de la synthèse d'ARN: la rifampicine.
 - d. L'inhibition des voies métaboliques: les sulfamides, les analogues de l'acide folique.
- (Tenover, 2006).

2.4. Relation structure- activité des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activité antimicrobienne importante, probablement dus à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les constituants phénoliques sont supposés être reliés à leur toxicité relative envers les microorganismes avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires et faire des complexes avec les parois cellulaires bactériennes. Les quinones et les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également rompre les membranes microbiennes (Cowan, 1999). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telles que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'agir synergiquement avec certains antibiotiques (Daglia, 2012).

2.5. Mode d'action des huiles essentielles

En règle générale, les huiles essentielles qui contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques comme le carvacrol, l'eugénol et le thymol possèdent des propriétés antibactériennes fortes contre les agents pathogènes. Il semble raisonnable que leur mécanisme d'action serait donc similaire à d'autres composés phénoliques comme la perturbation de la perméabilité des membranes cytoplasmiques, en agissant sur la force protomotrice, le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu des cellules (Burt, 2004).

2.6. La résistance microbienne aux antibiotiques

Elle est définie comme une résistance d'un micro-organisme à un médicament antimicrobien auquel il était précédemment sensible (Alwash et *al.*, 2013). Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants (Rizzo et *al.*, 2013; Sahu et *al.*, 2012), les maladies d'immunosuppression peuvent causer aussi le développement de cette résistance (Sivananthan, 2013).

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques à travers plusieurs mécanismes, notamment, la modification ou l'élimination des sites de liaison des agents antibactériens, la régulation de la production des enzymes qui peuvent désactiver l'agent antimicrobien, le réglage ou la modification des canaux membranaires par lesquelles l'antibiotique traverse les cellules (Tenover, 2006), le changement de la perméabilité cellulaire et le transfert horizontal de gènes de résistance (Rodríguez-Rojas et *al.*, 2013).

2.7. Souches microbiennes utilisées dans la présente étude

2.7.1. Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa est une bactérie mono-flagellée à Gram négative, présente dans divers environnements et souvent dans l'eau (Méar et *al.*, 2013). Elle est responsable d'environ 10% à 20% des infections nosocomiales et possède de multiples mécanismes de résistance qui sont encodés dans les chromosomes intrinsèques, y compris, le développement des pompes multi-résistantes à la pénétration des médicaments, la production de β -lactamases et les enzymes de modification des aminosides (Mahmoud et *al.*, 2013), la faible perméabilité de l'enveloppe cellulaire et sa grande

capacité d'adaptation, permettant la colonisation rapide aux différents environnements (Jimenez et *al.*, 2012).

2.7.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus est l'un des agents pathogènes les plus importants pour l'homme. C'est une bactérie anaérobie, à Gram-positif, elle est découverte par le Dr Alexander Ogstonin en 1880. Elle peut causer de nombreuses maladies; d'infections cutanées mineures à des maladies mortelles, telles que les abcès, la pneumonie, la méningite, endocardite, la septicémie, l'arthrite septique, l'ostéomyélite, infections intra-vasculaires (Chang et *al.*, 2013; David et Daum, 2010).

2.7.3. *Candida albicans*

C. albicans est le champignon opportuniste le plus fréquemment isolé de l'homme, c'est un membre de la classe des *Saccharomycetes*. Elle existe à l'état saprophyte habituellement dans les épithéliums muqueux des mammifères en particulier sur les muqueuses digestives et génitales. Le passage de la levure à un stade pathogène est favorisé par un certains nombre de conditions comme le changement dans les facteurs écologiques tels que l'utilisation d'antibiotiques à large spectre ou des médicaments immunosuppresseurs (Méar et *al.*, 2013; Whiley et *al.*, 2012).

2.7.4. Les *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus*, un membre de *Ascomycota phylum*, comprend plus de 185 espèces environ 20 d'entre eux causent des infections dangereuses chez l'homme et les animaux. Peut-être les espèces les plus infâmes de ce genre sont l'*Aspergillus flavus*, suivi de l'*Aspergillus fumigatus* (Yu et *al.*, 2005).

Le champignon filamenteux, *Aspergillus flavus*, est un agent pathogène qui cause l'aspergillose opportuniste invasive et non invasive chez l'homme, les animaux et les insectes. Il provoque également des réactions allergiques chez l'homme. *A. flavus* infecte les cultures agricoles et les céréales stockées et produit des métabolites carcinogènes comme les aflatoxines (Yu et *al.*, 2005)

D'autre coté, l'*Aspergillus niger* est le producteur de plusieurs mycotoxines, à savoir, l'ochratoxin A (OTA) qui est une néphrotoxine puissant possédant des propriétés tératogènes, immunosuppresseurs et cancérigènes. Les céréales et les aliments sont les principaux transporteurs de cette mycotoxine chez l'homme et les animaux. *Aspergillus niger* est aussi la responsable de la production des

différent mycotoxine de types fumonisine (FB) essentiellement le FB₂ qui est connus par son effet toxique et carcinogène (Soares et *al.*, 2013).

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

La plante *Mentha rotundifolia* a été récoltée au mois d'octobre 2012 dans la région de Djemila au Nord- Est de la Willaya de Sétif. L'identification de la plante a été faite au niveau du Département d'Ecologie et Biologie Végétale, Université Ferhat Abbas, Sétif 1.

Les parties aériennes de la plante sont séchées à une température ambiante et à l'ombre puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

1.1.2. Souches bactériennes et fongiques

L'activité antibactérienne et antifongique a été évaluée sur des souches de référence, trois champignons (*Aspergillus niger* 2CA936, *Aspergillus flavus* NRRL391, *Candida albicans* ATCC1024) et trois bactéries de l'American type culture collection (ATCC) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), ces souches ont été obtenues du laboratoire de microbiologie du centre hospitalier- universitaire de Sétif. La quatrième souche bactérienne *Streptococcus sp* est une souche clinique isolée d'un patient hospitalisé.

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont:

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- Le milieu Muller-Hinton pour l'étude de l'activité antibactérienne.
- Le milieu Muller-Hinton au sang frais pour la bactérie *Streptococcus sp*.
- Le PDA (*Potato Dextrose Agar*) pour les moisissures.
- Le milieu Sabouraud + chloramphénicole pour la levure *Candida albicans*.

1.2.2. Antibiotiques et antifongiques utilisés dans la présente étude

Gentamycine (GEN), Imipénème (IMP), Céfazoline (CZ), Céfoxitine (CX), Furane (F), Ampi/AC

Clavulanique (AMC), Oxaciline (OX), Tetracycline (TE), Rifampicine (RA), Pristinamycine (RP), Vancomycine (VA), AC Fusidique (FA), Céfoxitine (CX), Pipéraciline (PRL), Ciprofloxacine (), Clindamycine (CD). Pour les champignons on a utilisé trois antifongiques: amphotéricine (AM), chloramfénicol (CTR), nystatine (NY).

1.2.3. Matériel de laboratoire

Plusieurs réactifs chimiques et appareillages (Tab. IV) ont été utilisés dans la présente étude (extraction, dosage et activités biologiques). Les réactifs sont de grade analytique et ont été fournis par Sigma, Fluka et Merck.

Tab. IV: Les produits chimiques et les appareillages utilisés dans la présente étude.

Appareillages	Réactifs chimiques
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Autoclave (SELECTA. P) ✓ Balance de précision (OHALUS) ✓ Chauffe ballon (BIBBY) ✓ Clévenger ✓ Etuve (Memmert) ✓ Micropipettes (ISOLAB) ✓ Plaque chauffante (J.P.SELECTA). ✓ Evaporateur rotatif (Büchi). ✓ Spectrophotomètre (SECOMAN). ✓ Soxhlet ✓ Vortex (Techno Kartell TK 3S) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH[*]). ➤ Acide ethylenediamine tétraacétique (EDTA). ➤ Acide gallique ➤ Acide linoléique. ➤ Acide trichloracétique (TCA). ➤ Butylated hydroxyanisole (BHA). ➤ Chlorure d'aluminium (AlCl₃). ➤ Chlorure ferrique (FeCl₃). ➤ Chlorure ferreux (FeCl₂). ➤ Ferrozine[3-(2-pyridyl)-5, 6-bis (4-phenyl-sulfonicacid)-1, 2, 4-triazine). ➤ Ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆]. ➤ Folin-Ciocalteu. ➤ Solvants (Acétone, Ethanol, méthanol, Tween 80, DMSO). ➤ Quercetine. ➤ Tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6). ➤ β- carotène.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

Les extraits méthanoliques des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* sont obtenus par deux méthodes d'extraction différentes.

2.1.1. Extraction par macération

Suivant le protocole d'extraction décrit par (Stanković, 2011); le matériel végétal broyé (20 g) est soumis à une extraction par macération dans le méthanol pendant 48 heures avec renouvellement de solvant après 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont filtrés sur papier filtre, les filtrats sont évaporés à sec au moyen d'un évaporateur rotatif, le résidu sec est repris dans le méthanol et gardé à 4°C.

2.1.2. Extraction au Soxhlet

20 g du broyat végétal sont placés dans une cartouche et soumis à l'extraction au Soxhlet. Après 6 heures, la cartouche est retirée et le méthanol chargé d'extrait de la plante est récupéré pour être concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Bichra et *al.*, 2012).

2.1.3. Hydrodistillation

L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le broyat végétal est complètement immergé dans l'eau, le tout est ensuite porté à ébullition. On maintient le chauffage à une température douce pendant 3 h, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle et l'eau se séparent par différence de densité et enfin cette huile est conservée dans des flacons opaques à température basse (4-5 C°).

2.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été effectués sur les extraits méthanoliques de la plante *Mentha rotundifolia*. La détection de quelques composés est réalisée par l'utilisation des méthodes décrites par Vijayalakshmi et *al.*, 2012; Bagre et *al.*, 2007; Khaldi et *al.*, 2012.

2.2.1. Les polyphénols

Mettre 2 ml d'extrait dans un tube à essai puis ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée.

2.2.2. Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 2 ml de l'extrait avec 2 ml d'acide sulfurique et 2 ml de NH_4OH . La présence des flavonoïdes est mise en évidence si la coloration s'accroît en présence de l'acide et vire au bleu violacé en milieu basique cela signifie la présence des anthocyanes.

2.2.3. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait, quelques gouttes de solution de FeCl_3 diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins.

2.2.4. Terpénoïdes

Leur détection consiste à traiter 0.5 ml de l'extrait avec 2 ml de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. En cas de réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre à la zone de contact des deux liquides.

2.2.5. Saponosides

Mettre 3ml d'extrait dans un tube à essai, puis agiter fortement pendant 30 secondes et laisser reposer 15 secondes. Si la mousse persiste pendant cette période cela signifie qu'il y a des saponosides.

2.2.6. Quinones

1 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté à 1 ml d'extrait. Un test positif est révélé par la formation de la couleur rouge.

2.2.7. Anthraquinones

La détection des anthraquinones est réalisée en ajoutant quelques gouttes de HCL à 0.5 ml d'extrait. L'apparition d'un précipité de couleur rouge indique la présence d'anthraquinones.

2.3. Analyse quantitative des extraits méthanoliques

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ *Principe*

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation en milieu alcalin de ce réactif par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la coloration produite qui a une absorbance maximale à 765nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans l'extrait analysé (Georgé et *al.*, 2005).

➤ *Mode opératoire*

A 200 μ l d'extrait, on ajoute 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 minutes; 800 μ l de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 :7,5 %) sont ajoutées. Les tubes sont immédiatement agités, puis incubés à une température ambiante pendant deux heures. La densité optique du complexe formé est lue à 765 nm contre un blanc. L'étalon choisi est l'acide gallique (AG). Les teneurs des polyphénols totaux sont exprimées en microgramme équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (Li et *al.*, 2007). Les mesures sont réalisées deux fois.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium selon le protocole décrit par Kosalec et *al.* (2004) avec quelques modifications.

➤ *Principe*

Les méthodes qui ont été rapportées pour la détermination des flavonoïdes sont basées sur la formation d'un complexe de chlorure d'aluminium - flavonoïde qui est l'une des procédures analytiques les plus utilisées pour la détermination de la teneur en flavonoïdes dans diverses plantes (Humadi et Istudor, 2008).

➤ *Mode opératoire*

La quantification des flavonoïdes est réalisée en ajoutant à 1 ml d'extraits (préparés dans l'éthanol), 1 ml d'AlCl₃ à 2% dans le méthanol. Après une agitation vigoureuse, l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance de la solution est déterminée à 430 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est établie avec la quercétine en qualité de flavonoïde standard.

Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait. Les mesures sont réalisées deux fois.

2.3.3. Dosage des flavones et flavonols

Les flavones et flavonols sont mesurés par la méthode du trichlorure d'aluminium AlCl₃ suivant le protocole réalisé par Kosalec et *al.* (2004).

On met dans un tube à essai, 0,5 ml de l'extrait, 1,5 ml d'éthanol, 0,1ml d'AlCl₃, 0,1 ml d'acétate de potassium (CH₃COOK) (1M), 2,8 ml d'eau distillée. Le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 415 nm. La quercétine est utilisée comme standard. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait. Les mesures sont réalisées deux fois.

2.4. Analyse des huiles essentielles

2.4.1. Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse GC a été réalisée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse, Shimadzu GC-2010, équipé d'un détecteur FID et une colonne capillaire Teknokroma 5 MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0.25 µm). Les températures de l'injecteur et le détecteur sont maintenus à 280 °C et 300 °C respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un flux de 1,03 ml / min, la température du four est programmée de 60 (maintenue fixée pendant 5 minutes) à 280 C° à une vitesse de 3 °C/ min.

2.4.2. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS)

L'huile a été analysée par GC / MS en utilisant un détecteur sélectif de masse Shimadzu GCMS-QP2010 relié à un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC-2010. La séparation a été

➤ *Mode opératoire*

1ml de chacune des différentes concentrations des solutions des extraits (de 50 à 300 µg/ml pour EMM et EMS, de 100 à 3500 µg/ml pour l'HE et de 5 à 50 µg/ml pour le BHA) a été incubé avec 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH'. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances ont été lues par un spectrophotomètre UV-visible à 515nm. Le BHA est pris comme antioxydant de référence.

Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH' par les extraits de *Mentha rotundifolia* a été calculé comme suit: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

A_C: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

A_E: absorbance en présence des extraits ou de BHA.

Les mesures sont réalisées deux fois.

2.4.2. Chélation du fer ferreux

Dans ce test, le pouvoir chélateur est évalué selon la méthode décrite par Le et *al.* (2007).

➤ *Principe*

La ferrozine forme en présence du fer ferreux un chromophore de couleur rouge (Fe²⁺-Ferrozine), qui présente un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée, ce qui aboutit à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement (Le et *al.*, 2007).

➤ *Mode opératoire*

Cinq cent microlitres des extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations (de 0.50 à 3.5 mg/ml pour EMM et EMS et de 10 à 100 µg/ml pour l'EDTA) sont additionnées à 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrozine (5 mM) sont ajoutés et le mélange est agité puis laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe²⁺-Ferrozine est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: absorbance en absence de chélateur (contrôle négatif).

A_E: absorbance en présence du chélateur (extraits ou EDTA).

Les mesures sont réalisées deux fois.

2.4.3. Pouvoir réducteur: FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Orhan et *al.* (2013) avec quelque modification.

➤ *Principe*

Le test du pouvoir réducteur consiste à évaluer l'aptitude d'un échantillon à donner un électron convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} qui peut être quantifiée par la mesure de la formation de la couleur bleu (bleu de Prusse) du ferricyanide de potassium à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur (Gholivand et *al.*, 2010).

➤ *Mode opératoire*

A 1 ml de chaque solution d'extrait à des concentrations différentes (de 50 à 1000 μ g/ml pour EMM et EMS, de 0.05 à 3 mg/ml pour l'HE et de 20 à 150 μ g/ml), on ajoute 2,5 ml de la solution du tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont additionnés. Le tout est agité vigoureusement. Enfin, on prélève 2,5 ml de chaque tube et on ajoute 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le BHA est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience. Les mesures sont réalisées deux fois.

La CE_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 nm (Barros et *al.*, 2010). Elle est calculée à partir de l'équation de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

2.4.4. Test de blanchissement du β - carotène/acide linoléique

➤ *Principe*

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des extraits de plantes. En effet, l'acide linoléique oxydé en radical peroxyde agit sur le β -carotène de couleur orange qui devient incolore. La présence d'antioxydants dans l'extrait de plante par exemple inhibe cette décoloration dans le milieu gélosé (Graven et *al.*, 1992; Belhattab, 2007).

➤ *Mode opératoire*

On introduit 1.125g d'agar dans un erlenmeyer auquel on ajoute 150 ml d'eau distillée; Après chauffage sur une plaque chauffante, la solution est refroidie à 50°C avant d'ajouter une émulsion de β -carotène / acide linoléique préalablement préparée par solubilisation de 7.5 mg de β -carotène dans 7.5 ml d'acétone et de 7.5 μ l d'acide linoléique dans 1,5 ml de méthanol. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée à froid, puis distribuée dans des boîtes de pétri. À l'intérieur des puits creusés dans la gélose. A partir des solutions de 1 mg/ml, différents volumes des extraits (10 μ l, 30 μ l, 50 μ l) ou des témoins (30 μ l) sont déposés. La lecture se fait après 4 heures d'incubation à 45°C. Le BHA et la quercétine sont utilisés comme témoins positifs. L'expérience est réalisée deux fois (Belhattab., 2007).

2.6. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* est évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (Belhattab et al., 2004)

2.6.1. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2.6.2. Préparation des solutions des extraits

Les extraits méthanoliques secs ont été dissouts dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère de 500 mg/ml. L'huile essentielle a été dissoute dans le même solvant pour préparer les différents dilutions (1/2, 1/5, 1/10).

2.6.3. Préparation des suspensions bactériennes et fongiques

Les tests antibactériens sont effectués à partir de colonies jeunes de 18 à 24 h en phase de croissance exponentielle. Une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche. Les spores des moisissures sont préparées d'une culture de sept jours sur gélose de PDA et mises en suspension dans de l'eau distillée stérile contenant 1% de Tween 80 pour une meilleure dispersion des spores. Après agitation, la suspension de spores est ajustée après dénombrement sur cellule de Malassez à la concentration de 10^5 - 10^7 spore/ml.

2.6.4. Ensemencement des boîtes

- Tremper un écouvillon sec stérile dans l'inoculum.
- Eliminer l'excès d'inoculum en pressant l'écouvillon et en le faisant roulet contre les parois du tube au dessus du niveau de liquide.
- Ensemencer en stries sur toute la surface des boîtes à trois reprises et passer enfin l'écouvillon sur le bord de la gélose.
- Laisser sécher la boîte pendant quelques minutes avant de déposer les disques sur la gélose.
- Recharger l'écouvillon chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

2.6.5. Préparation des disques

La préparation des disques se fait à partir du papier Wattman qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre. Les disques sont chargés de principe actif à testés (10 µl et 20 µl d'extraits méthanoliques correspondant à 5mg/disque et 10 mg/disque respectivement et 10 µl de l'huiles essentielles à différentes dilutions). Finalement, on prépare des disques imprégnés d'eau distillée stérile et d'autres imprégnés de DMSO. Ces deux dernières catégories de disques serviront de contrôle négatif. Différents disques d'antibiotiques et d'antifongiques standards ont également été utilisés comme control positif (le choix des antibiotiques est fait selon le genre de la bactérie).

2.6.6. Application

Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu gélosé, préalablement ensemencé. Ils doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C pour les bactéries, pendant 48 heures à 37 °C pour la levure et pendant 72 heures à 28°C pour les moisissures. Le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques est alors mesuré. Les déterminations sont réalisées deux fois.

2.7. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Les comparaisons entre les différents extraits et entre les extraits et les témoins positifs et la détermination des taux de signification sont faites par le test de Student. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

1. RESULTATS

1.1. Rendement des extractions

Après extraction et élimination de toute trace de solvant; le rendement de l'extrait est calculé par la formule suivante

$$R\% = (M_1 / M_0) \times 100$$

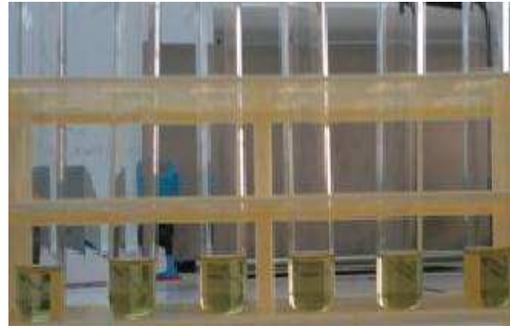
Où M_0 : la masse de la matière végétale traitée et M_1 : La masse de l'extrait.

Le calcul des rendements a montré que l'extrait méthanolique obtenu par soxhlet (EMS) est plus rentable (09.2 % (m/m)) que celui obtenu par macération (EMM) (16.05 % (m/m)).

Le rendement en huile essentielle est calculé à partir du volume de l'huile essentielle par rapport au poids sec du broyat végétale utilisée dans l'hydrodistillation. Ce rendement est de l'ordre de 0.7 % (m/v).

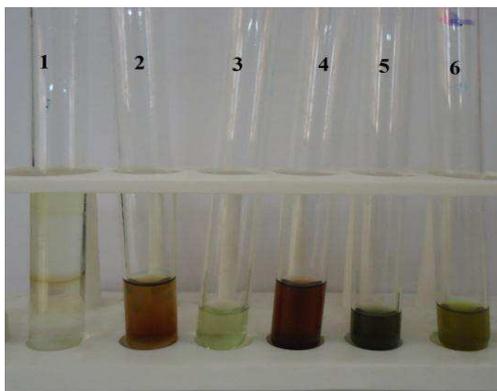
1.2. Le screening phytochimique

Le screening phytochimique a été effectué sur les extraits méthanoliques (EMM) et (EMS) de *Mentha rotundifolia*. Le choix du test est en fonction du métabolite secondaire à détecter (Fig. 10). Plusieurs groupes de métabolites secondaires ont été mis dans les extraits. Il s'agit de polyphénols, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes et quinones dans les deux extraits avec absence des saponosides et des intraquinones (Tab.V).



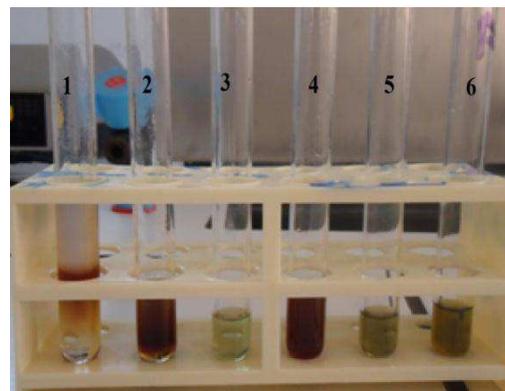
a

EMM



b

EMS



c

Figure. 10: Screening phytochimique des extraits méthanoliques de la plante *Mentha rotundifolia*

1: terpénoïdes, 2: quinone, 3: intraquinone, 4: polyphénols, 5: flavonoïdes, 6: tanins.

a: avant l'ajout des réactifs, b, c: après l'ajout des réactifs.

Tab. V: types de composés retrouvés dans les extraits méthanoliques.

Famille des composés	EMM	EMS
Polyphenols	+	+
Flavonoïdes	+	+
Tanins	+	+
Saponosides	-	-
Terpénoïdes	+	+
Quinones	+	+
Intraquinone	-	-

- : Absence, +Présence

1.3. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux, des flavones et flavonols

La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en flavones et flavonols des extraits méthanoliques des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* est déterminée en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu pour les polyphénols (Fig. 11) et de trichlorure d'aluminium pour les flavonoïdes (Fig. 12), les flavones et les flavonols (Fig. 13). Les résultats obtenus à partir des courbes d'étalonnages montrent que l'extrait méthanolique au Soxhlet est plus riche en polyphénols et flavonoïdes que l'extrait méthanolique obtenu par macération (Tab. VI).

La différence entre les deux extraits est statistiquement significatif ($p < 0,05$) pour le dosage des polyphénols et les flavonoïdes et non significatif pour le dosage des flavones et flavonols.

Tab. VI: Teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en flavones et flavonols des extraits méthanoliques de *Mentha rotundifolia*. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD.

Extrait	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Flavones et Flavonols ^(b)
EMM	141.571 \pm 0.143	15.636 \pm 0.030	45.426 \pm 1.357
EMS	168.642 \pm 1.642	33.045 \pm 0.76	47.071 \pm 3.214

^(a) μ g équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

^(b) μ g équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

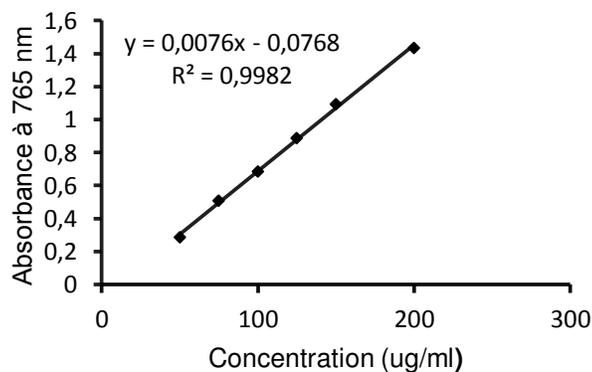


Figure. 11: Droite d'étalonnage tracée en fonction des concentrations croissantes de l'acide gallique en fonction des absorbances relatives pour le dosage des polyphénols totaux.

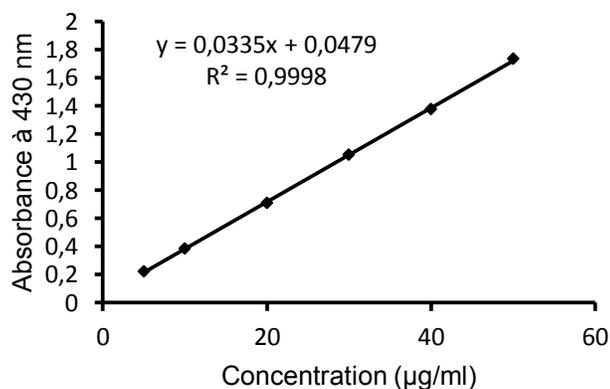


Figure. 12: Droite d'étalonnage tracée en fonction des concentrations croissantes de quercétine en fonction des absorbances relatives pour le dosage des flavonoïdes

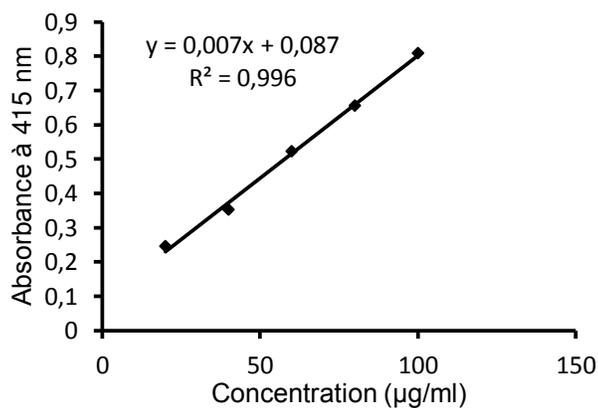


Figure. 13: Droite d'étalonnage tracée en fonction des concentrations croissantes de quercétine en fonction des absorbances relatives pour le dosage des flavones et flavonols.

1.4. Composition chimique de l'huile essentielle

La chromatographie en phase gazeuse (CG) de l'HE de *M. rotundifolia* a permis d'isoler 43 composés représentant 100 % de l'huile essentielle (Fig. 14). Le couplage de la CG à une spectrométrie de masse (SM) a permis d'identifier les composés de l'HE (Tab. VII). Le constituant majoritaire était l'oxyde de trans-pipéritène (66,39%) suivi de limonène (3,42%). L'huile est dominée par les monoterpènes oxygénés comme oxyde de cis-pipéritène, alpha-terpinéol, 1,8-cineole, 1-bornéol, oxyde de cis-pipéritone. Suivi des monoterpènes hydrocarbonés comme alpha-pinène, 2-beta-pinène, sabinène, dl-limonène, myrcène et enfin les sesquiterpènes essentiellement les sesquiterpènes hydrocarbonés comme alfa-humulène, cadinène, trans-caryophyllène et D-germacrène, beta-farnésène. Les sesquiterpènes oxygénés tel que t-muurolool.

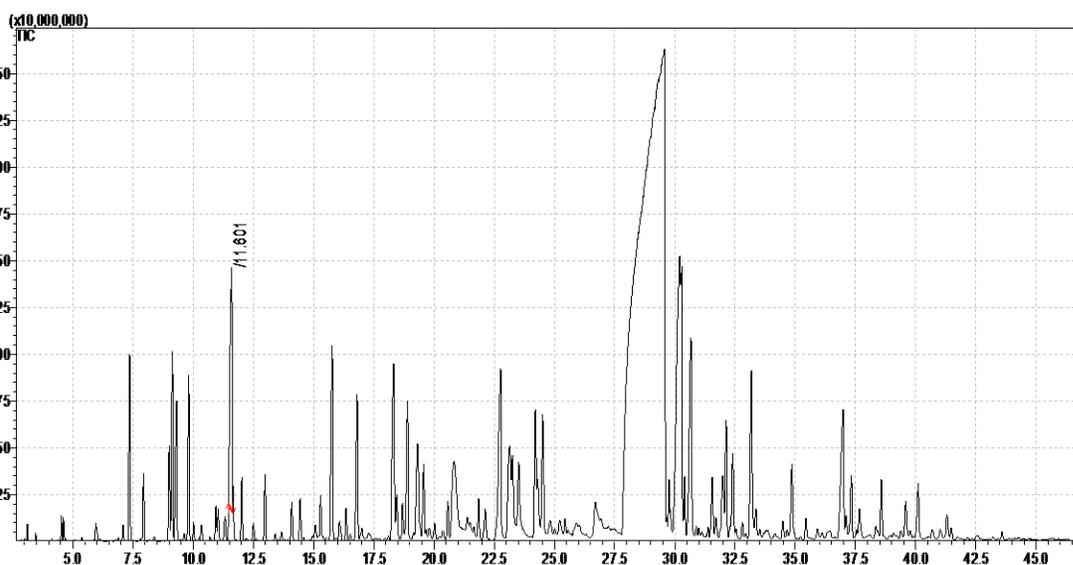


Figure.14: Profil de fractionnement chromatographique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

Tab. VII: Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*.

Composés	RT	%
α -Thujène	7,086	0,1
(-) α -Pinène	7,362	1,32
Camphène	7,936	0,39
Sabinène	9,003	0,66
2- β - Pinène	9,138	1,42
1- Octen-3-ol	9,307	1,16
Myrcène	9,817	1,17
3-Octanol (CAS) n-Octan-3-ol	10,012	0,11
Pseudolimonène	10,34	0,13

α - Terpinène	10,944	0,23
Para- Cymène	11,318	0,21
dl-Limonène	11,601	3,42
1,8-Cinéole	11,664	0,25
cis-Ocimène	12,018	0,4
gamma- Terpinène	12,984	0,44
1-Nonen-3-ol	14,091	0,26
Nonanal (CAS) n-Nonanal	15,286	0,28
Acétate d'octen-1-ol,	15,776	1,81
Acétate de 3-octanyl	16,346	0,23
1-Bornéol	18,328	2,12
Lavandulol	18,455	0,38
1-Nonanol	18,692	0,26
4-Terpinéol	18,903	1,28
Para- Cymèn-8-ol	19,322	1,04
α - Terpinéol	19,571	0,54
Isovalerate	21,855	0,27
Carvone	22,13	0,31
Oxide de cis pipéritone	22,768	2,39
Isopipéritènone	23,517	0,56
acétate d'endobornyl	24,211	1,18
Oxyde de cis-pipéritènone	24,32	0,54
Oxyde de trans-pipéritènone	29,578	66,39
p-Menthane-1, 2, 3-triol (CAS)	30,406	0,36
2,5,5,6,1a-Pentaméthyl-cis-1a,4a,5,6,7,8-hexahydro-gamma-chromène	31,555	0,53
α -Humulène	31,997	0,68
(E)- β - Farnésène	32,137	0,96
(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrène	32,406	0,63
D- Germacrène	33,185	1,87
Butyrate <2-methyl-, phenylethyl->	33,367	0,24
Gamma- Cadinène	34,488	0,15
(-)- α -Muuroolène	35,444	0,2
t-Muurolol	40,109	0,48

RT : temps de rétention

1.5. Evaluation de l'activité antioxydante

1.5.1. Effet piègeur du radical DPPH^{*}

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* est comparée à celle du BHA et exprimée en IC₅₀. Ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH^{*} dans le milieu réactionnel, l'activité est inversement proportionnelle à la valeur d'IC₅₀. Les IC₅₀ sont calculées à partir des équations des courbes qui déterminent le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Fig. 15).

Les résultats ont montré que les différents extraits piègent les radicaux DPPH^{*} avec des IC₅₀ de l'ordre de (265,491 ± 2.221 µg/ml), (133.160 ± 11.346 µg/ml) et (1755±0,006 µg/ml) pour EMM et EMS l'huile essentielle respectivement. Cette activité reste toujours très inférieure à celle du standard, le BHA (20,701± 0.065 µg/ml) (Fig. 16).

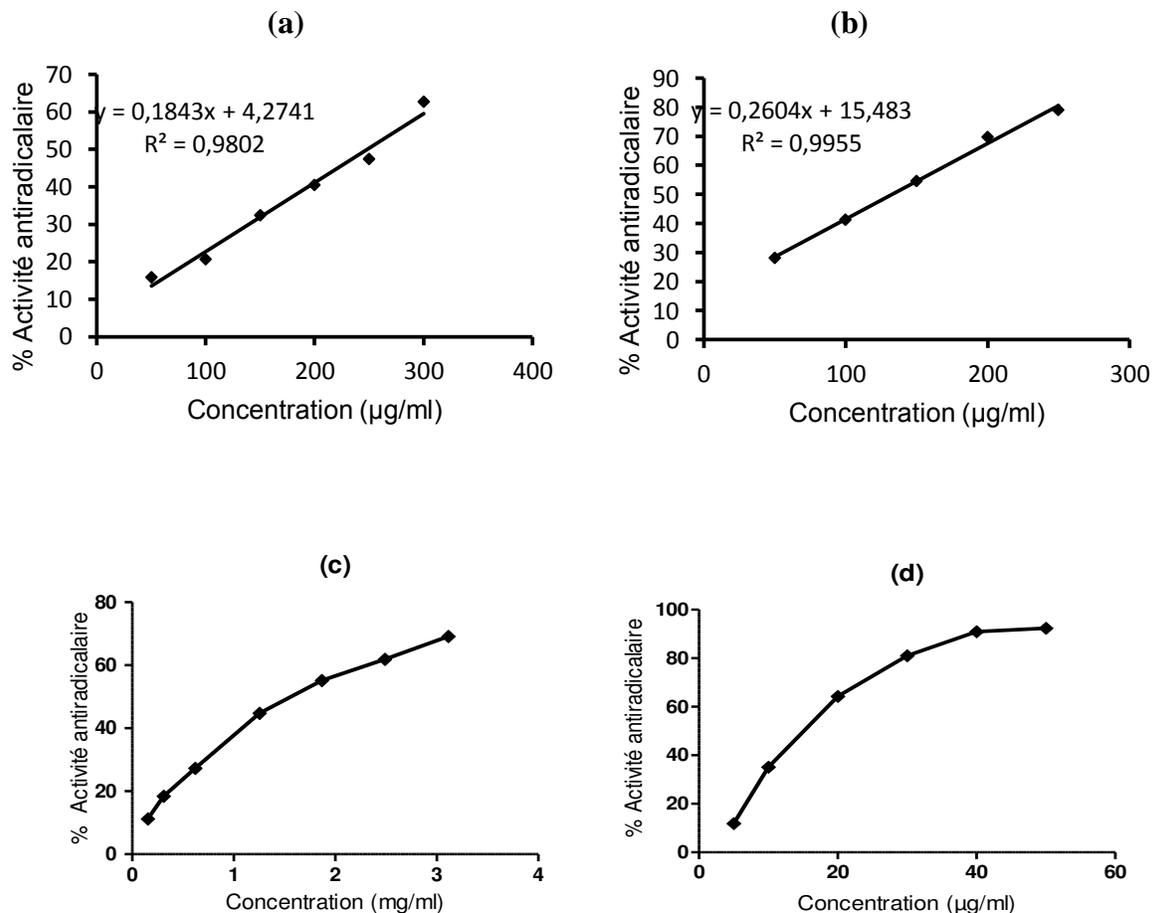


Figure. 15: courbes tracée en fonction des concentrations croissantes des EMM (a), EMS (b) de l'HE (c) et de BHA (d) et le pourcentage d'inhibition du DPPH'.

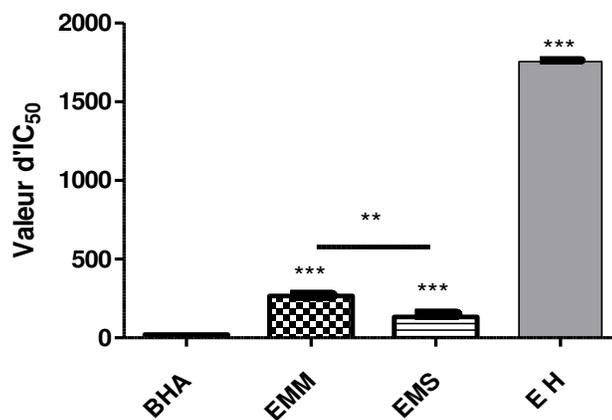


Figure. 16: Activités antiradicalaires des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* et de BHA manifestées dans le test de DPPH'. La comparaison est réalisée avec le BHA; **: $p \leq 0,01$, ***: $P \leq 0,001$.

1.5.2. Effet chélateur du fer ferreux

Ce test permet de mettre en évidence la capacité chélatrice des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques possèdent une activité chélatrice en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine (dose dépendante en comparaison avec l'EDTA). Par contre, l'huile essentielle n'a montré aucune activité chélatrice (Fig. 17). La concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur (EC_{50}) est présentée dans le (Tab. VIII). Les différences entre les extraits méthanoliques et l'EDTA et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Tab. III: les EC_{50} des extraits et d'EDTA. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} (mg/ml)
EMM	$3.417 \pm 0.011^{***}$
EMS	$2.194 \pm 0.038^{***}$
EDTA	0.0111 ± 0.06

-: pas d'activité, La comparaison est réalisée avec l'EDTA; $***: p \leq 0.001$.

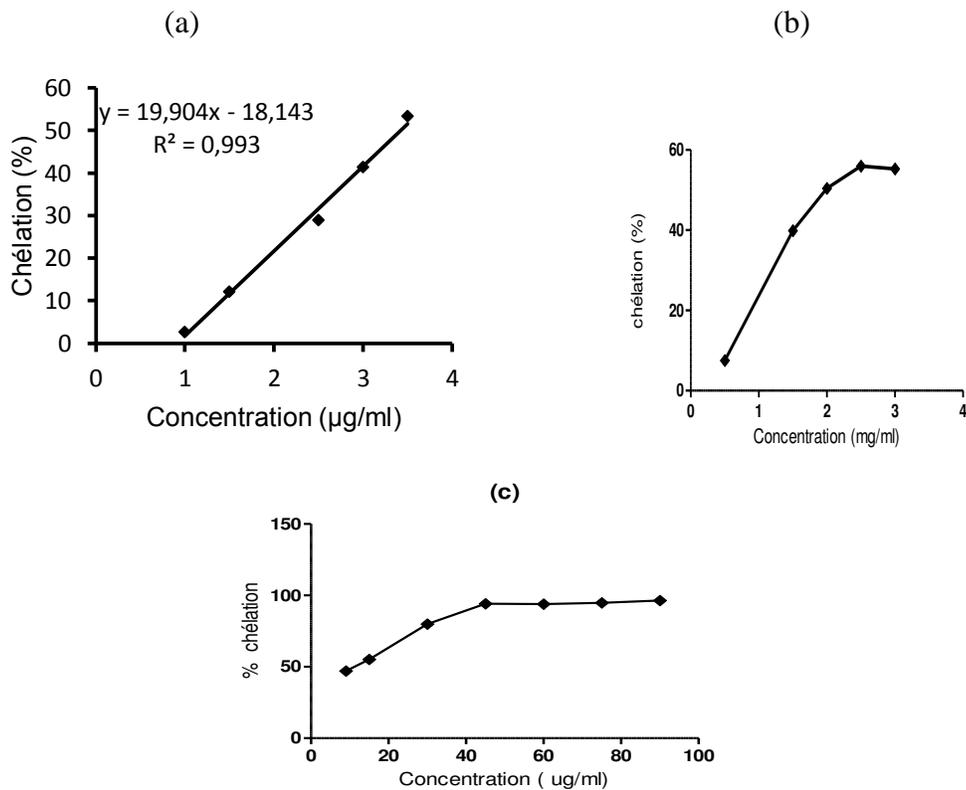


Figure. 17: courbes tracées en fonction des concentrations croissantes d'EMM (a), d'EMS (b), EDTA (c) et des pourcentages de chélation du fer ferreux.

1.5.3. Le pouvoir réducteur du fer ferrique

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est basée sur la capacité des constituants des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la Fig. 18 montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. Le Tab. IX résume les concentrations effectrices 50% (EC_{50}) des extraits et de BHA. Les différences entre les extraits méthanoliques, l'HE et le BHA sont statistiquement significatives (***: $p \leq 0.001$).

Tab.IX: Les EC_{50} des extraits et du BHA. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} (mg /ml)
EMM	$0.550 \pm 3.613^{***}$
EMS	$0.468 \pm 1^{***}$
L'huile essentielle	$1.625 \pm 0.004^{***}$
BHA	0.089 ± 0.285

Les comparaisons sont réalisées avec le BHA; ***: $p \leq 0.001$

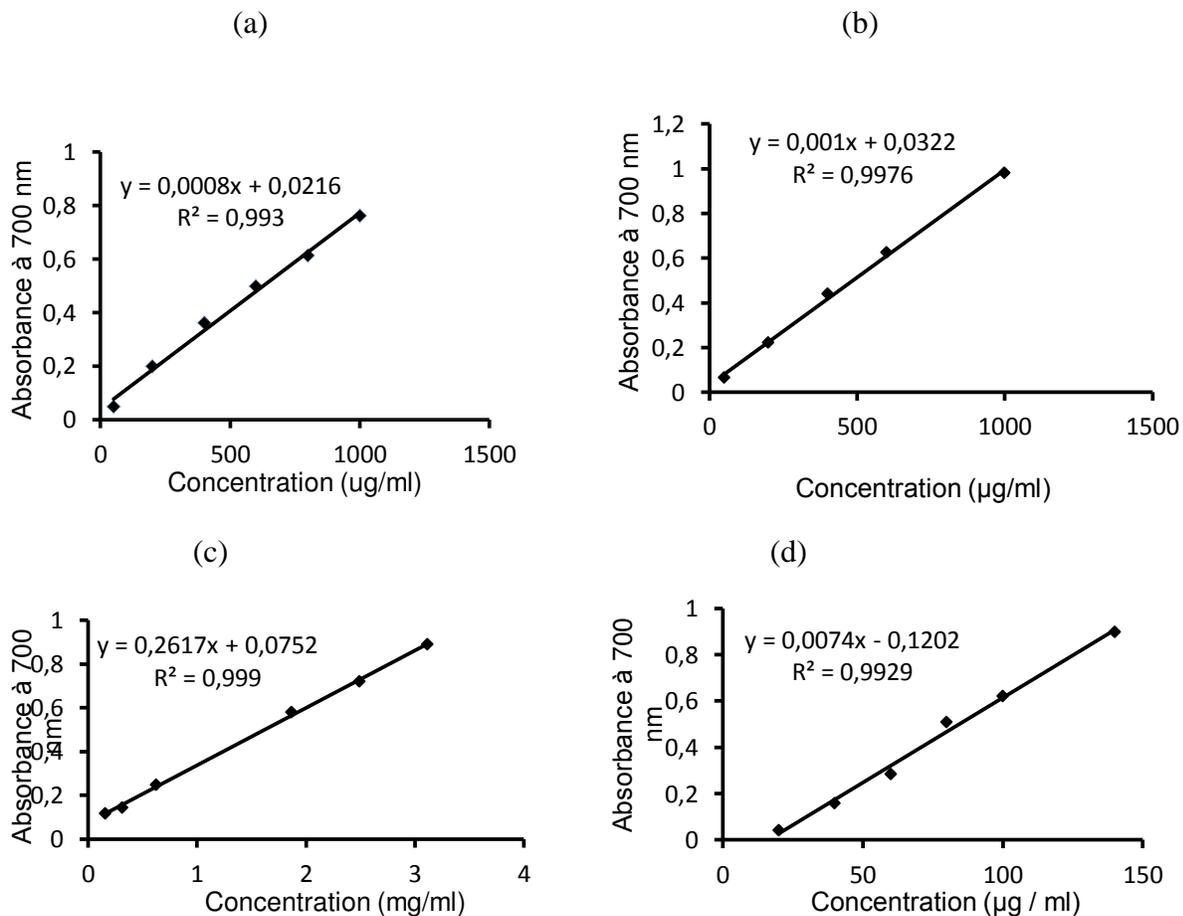


Figure. 18: courbes tracée en fonction des concentrations croissantes des EMM (a), EMS (b) de l'HE (c) et de BHA (d) et le pouvoir réducteur.

1.5.4. Test de blanchissement du β - carotène/acide linoléique

Après un temps d'incubation, en présence des extraits de *Mentha rotundifolia* et des témoins positif (la quercétine et le BHA) et négatif (le méthanol); un halo de couleur orange persiste autour des puits, alors que la surface de la gélose perd sa couleur orange suite à l'oxydation du β -carotène. Le diamètre des halos de conservation de la couleur orange est proportionnel au volume déposé (Fig. 19). Pour un volume de 30 μ l déposé, EMS montre un diamètre (12.5 mm) qui est plus petit que celui de EMS (14.5 mm), les valeurs trouvées restent légèrement inférieures à celles obtenus avec les antioxydants standards; la quercétine (15 mm) et le BHA (20 mm) pour les mêmes concentrations (1mg/ml). Par contre, l'huile essentielle a montré une zone de conservation de la couleur orange très faible, ne dépassant pas le périmètre du puits. Un blanchissement total de la gélose a été observé lors de l'utilisation du méthanol comme témoin négatif.

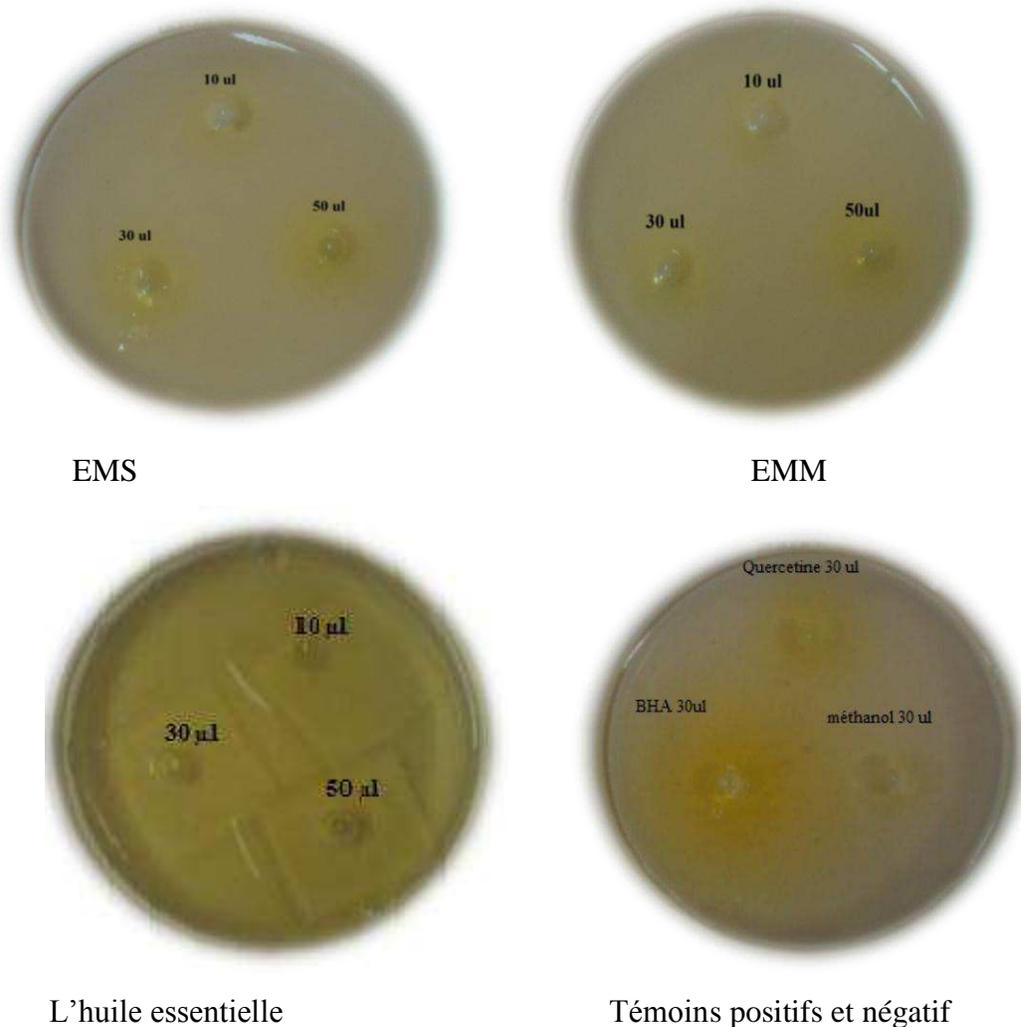


Figure. 19: Blanchissement du β -carotène- acide linoléique manifesté par les extraits de *Mentha rotundifolia* et les contrôles positifs et négatif.

1.6. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de la plante *Mentha rotundifolia* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé.

L'activité antimicrobienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à tester vis-à-vis de sept germes pathogènes (quatre bactéries, trois champignons).

1.6.1. Sensibilité aux antibiotiques et aux antifongiques

Dix sept antibiotiques et trois antifongiques standards ont été testés pour leurs effets sur les microorganismes sélectionnés pour cette étude (Fig.20). Leurs effets étaient hétérogènes. *E. coli* était plus sensible à l'IPM qu'aux autres antibiotiques, *P. aeruginosa* au CIP avec une zone d'inhibition de 39 mm. *S. aureus* était plus sensible au CX et CD et pour *Streptococcus* .sp la grande inhibition a été enregistrée avec le RP (31mm) (Tab. X). Concernant les champignons, CRT est l'antifongique le plus actif par rapport à NY et AB. *Candida. albicans* était la plus sensible aux antifongiques testés (Tab. X).

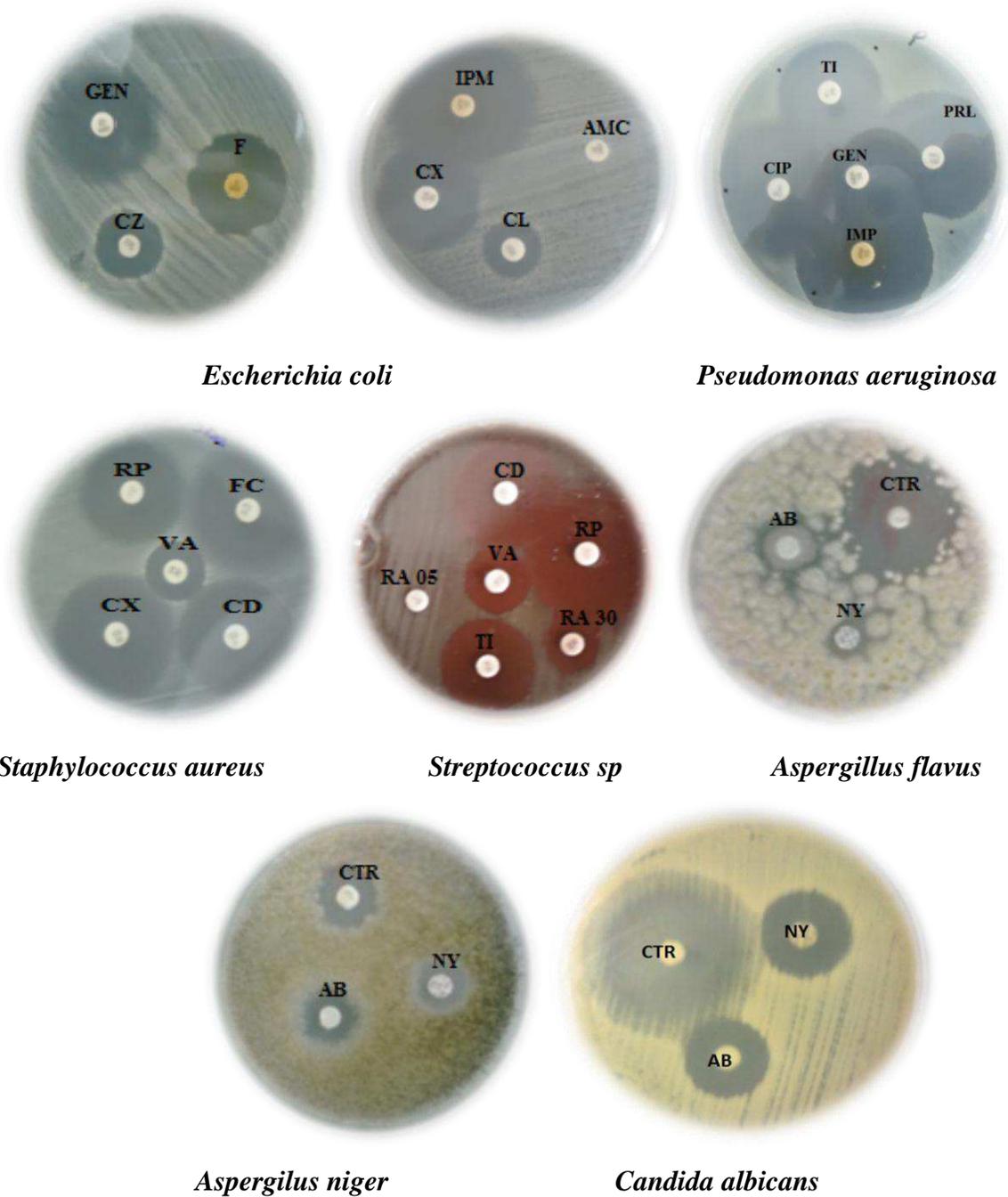


Figure. 20: Sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques et antifongiques

Tab. X: diamètre des zones d'inhibition en (mm) des différents microorganismes en présence de quelques antibiotiques et antifongiques.

Souche AB	<i>E. coli</i> ATCC2 5922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>Strepto- coccus .SP</i>	<i>A.niger</i> 2CA936	<i>A.flavus</i> NRRL391	<i>C.albicans</i> ATCC1024
AMC	R	-	-	-	-	-	-
CZ	19	-	-	-	-	-	-
F	26	-	-	-	-	-	-
CL	15	-	-	-	-	-	-
CX	27	-	-	-	-	-	-
IPM	37	38	-	-	-	-	-
GEN	28	12.5	-	-	-	-	-
PRL	-	34	-	-	-	-	-
CIP	-	39	-	-	-	-	-
TI	-	27	-	-	-	-	-
FC	-	-	26	-	-	-	-
RP	-	-	30	31	-	-	-
VA	-	-	16	21	-	-	-
CD	-	-	30.5	28	-	-	-
CX	-	-	32	-	-	-	-
RA	-	-	-	27	-	-	-
TE	-	-	-	24	-	-	-
AB	-	-	-	-	9	8	19
CTR	-	-	-	-	20	24	33
NY	-	-	-	-	11	11	21

Légende: AB: antibiotique -: non testé

Les diamètres des disques sont inclus dans la mesure de diamètre de la zone d'inhibition.

1.6.2. Sensibilité microbiennes aux extraits et à l'huile essentielle

L'activité antimicrobienne des témoins négatifs (eau distillée, DMSO) et des extraits méthanoliques au Soxhlet et par macération de *M. rotundifolia* évaluée par la méthode de diffusion sur gélose, a permis de révéler l'inactivité sur la croissance de toutes les souches microbiennes testées. Par contre, l'huile essentielle possède une activité moyenne sur les souches bactérienne et une activité forte sur les champignons qui est supérieure à celle obtenue par les antifongiques standards. D'après les résultats obtenus ; les champignons ont été donc plus sensible que les bactéries à l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* (Fig. 21).

La souche *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la plus résistante vis-à-vis de cette huile essentielle suivi de *Streptococcus sp* et enfin *S. aureus* (Tab. XII).

Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est inversement proportionnel à la dilution (Tab. XII).

Tab. XI: Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de différentes dilutions de l'huile essentielle.

microorganisme	Dilutions			
	1/1	1/2	1/5	1/10
<i>Escherichia coli</i>	14.5 ± 0.5	12.25 ± 0.25	10.5 ± 0.5	6.25 ± 0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.75 ± 1.25	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.5 ± 0.5	12 ± 1	7.75 ± 0.75	6
<i>Streptococcus sp</i>	9.5 ± 1.5	8.75 ± 1.25	6	6
<i>Aspergillus niger</i>	48 ± 0	43.5 ± 1.5	39.5 ± 1.5	31 ± 1
<i>Aspergillus flavus</i>	54 ± 0	48 ± 2	34.5 ± 0.5	24.5 ± 1.5
<i>Candida albicans</i>	48.5 ± 0.5	43.75 ± 1.25	31 ± 0	16.5 ± 0.75

Les diamètres des disques (6 mm) sont inclus dans la mesure de diamètre de la zone d'inhibition.

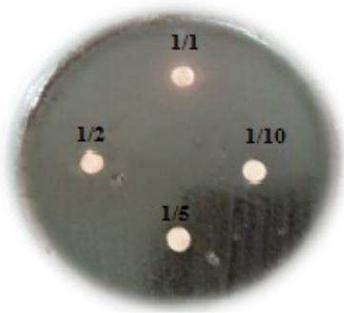
1.6.3. Dilutions minimales inhibitrices (DMI)

Les DMI ont été déterminés à partir d'une gamme de dilution de l'huile essentielle et notés après 24 h d'incubation pour les bactéries, 48 h pour la levure et 72 h pour les moisissures (Tab. XII)

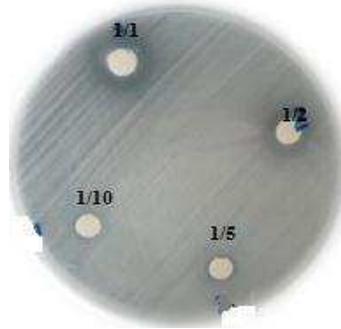
A. Niger est le champignon le plus sensible parmi ceux testés, avec un diamètre d'inhibition minimal de 7.5 ± 1.5 mm obtenu avec la dilution 1/45. Tandis que, les bactéries, plus résistantes à cette huile, ont manifesté des sensibilités différentes. *E. coli* était la plus sensible, l'inhibition de sa croissance est achevée avec une dilution minimale de 1/10 ce qui correspond à 6.25 ± 0.75 mm.

Tab. XII: Les valeurs des zones d'inhibition équivalentes aux dilutions minimales inhibitrices.

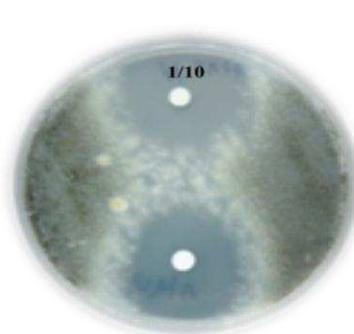
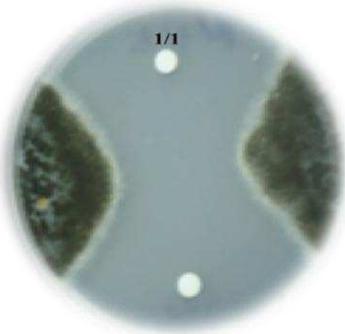
Microorganisme	Dilutions Minimales Inhibitrices	Zone d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	1/10	6.25 ± 0.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/1	9.75 ± 1.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/8	6.5 ± 0.5
<i>Streptococcus sp</i>	1/2	8.75
<i>Aspergillus niger</i>	1/45	7.5 ± 1.5
<i>Aspergillus flavus</i>	1/35	11.5
<i>Candida albicans</i>	1/35	07 ± 1



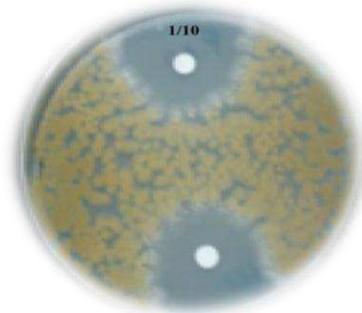
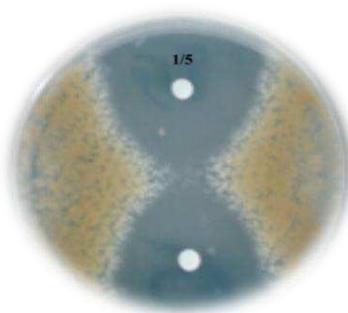
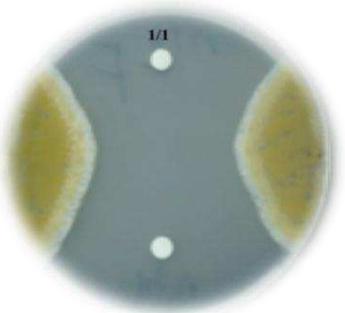
Streptococcus sp



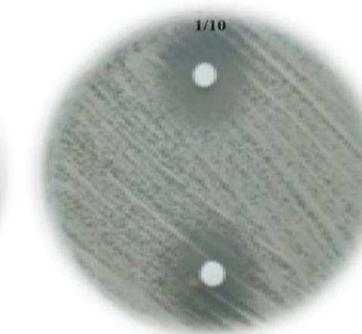
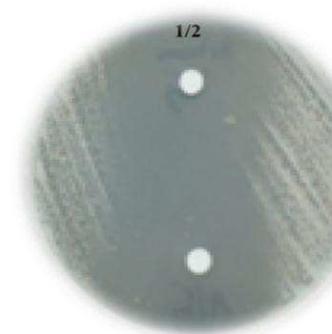
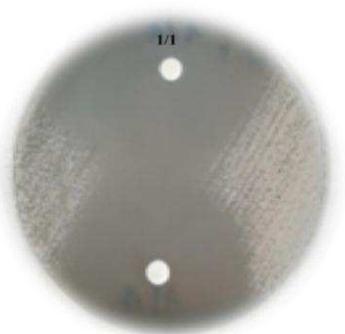
Staphylococcus aureus



Aspergillus niger



Aspergillus flavus



Candida albicans

Figure. 21: Effet de l'HE de la plante *Mentha rotundifolia* sur les souches microbiennes testées.

2. DISCUSSION

2.1. Extraction

L'extraction est une étape importante dans l'isolement des composés bioactifs des plantes. Au cours de l'extraction, les solvants diffusent dans le matériel végétal solide et solubilisent les composés qui ont une polarité similaire (Tiwari et *al.*, 2011). La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines et tanins. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (Mahmoudi et *al.*, 2013). La séparation effective des composés bioactifs à partir d'une matrice végétale complexe est une procédure difficile en raison de la co-extraction d'autres composés qui sont indésirables dans l'étude de certaines activités (Bimakr et *al.*, 2011).

Parmi les solvants les plus utilisés dans l'extraction des composés bioactifs des plantes le méthanol qui peut extraire un nombre important de ces composés comme les anthocyanines, terpénoïdes, saponines, tannins, xanthoxyllines, totarol, quassinoids, lactones, flavones, phénones et les polyphénols (Khaldi et *al.*, 2012; Tiwari et *al.*, 2011).

Les résultats obtenus pour les extraits des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* montrent que le rendement d'extrait méthanolique au Soxhlet (16.05%) est élevé par rapport à celui obtenu par macération (9.2%). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les procédures d'extraction influent sur le rendement. Plusieurs études montrent que l'extraction à chaud donne des rendements supérieurs que les procédures d'extraction à froid (Mahmoudi et *al.*, 2013, Teixeira et *al.*, 2012).

Nos résultats sont similaires aux résultats d'une étude réalisée par Albayrak et *al.* (2013) où l'extrait méthanolique au Soxhlet de la plante *Mentha piperita* a donné un rendement de 16%.

Quant à l'huile essentielle, le rendement était de 0.7 %. Ce taux est proche de celui obtenu par Brada et *al.* (2007) qui ont trouvé que les parties aériennes de la même plante collectée en trois localités en Algérie ont présenté un rendement de 0.8%. Mais il ne s'accorde pas avec les résultats obtenus par Derwich et *al.* (2010) qui indiquent que la teneur en huile essentielle des parties

aériennes de cette plante provenant du Maroc est de 1.54 %. Une autre étude faite par Benayad. (2008) sur la même espèce provenant aussi du Maroc, a donné une teneur égale 4.33%.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment l'espèce, la région de récolte, la période de récolte, les facteurs climatiques et la technique d'extraction (Hafsé et *al.* 2013).

2.2. Le screening phytochimique

La valeur médicinale des plantes est liée à leurs constituants phytochimiques bioactifs qui produisent des actions physiologiques précises sur le corps humain. Certains des plus importants de ces composants bioactifs sont les tannins, les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les stéroïdes, les anthraquinones, les coumarines, les stérols et les terpènes (Ulah et *al.*, 2011).

Dans notre étude la détection de quelques composés phytochimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité ou un changement de couleur spécifique.

Ce screening nous a permis d'avoir une idée claire sur les différentes familles des composés existants dans les extraits méthanoliques de la plante *Mentha rotundifolia*. Les résultats obtenus montrent la présence des terpénoïds, quinone, anthraquinone, polyphénols, flavonoïdes, tanins et l'absence des saponines et anthraquinones.

Nos résultats sont proches de ceux d'Ullah et *al.* (2012) où les tests phytochimiques de la plante *Mentha spicata* ont montré la présence des: alcaloïdes, flavonoïdes, stéroïdes, coumarines, stérols et terpènes avec absence des saponines et anthraquinones. Selon Malik et *al.* (2012), les extraits de la plante *Mentha arvensis* sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, tannins, diterpènes, glycosides cardiaque avec absence de saponines.

2.3. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavones et flavonols

La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux, en flavones et flavonols des extraits méthanoliques des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* est déterminée en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu pour les polyphénols et de trichlorure d'aluminium pour les flavonoïdes, flavones et flavonols.

La raison principale pour laquelle on a choisi le dosage de ces classes de métabolites secondaires, réside dans le fait que les polyphénols et les flavonoïdes constituent les classes responsables de l'activité antioxydante des plantes (Osman et *al.*, 2013).

La teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavones et flavonols dans les extraits des parties aériennes de *Mentha rotundifolia* montre qu'EMS contient des teneurs élevées par rapport à EMM (Tab. VI)

Nickavar et *al.* (2008) ont rapporté que la teneur en polyphénols totaux de la même espèce provenant d'Iran est de l'ordre de $331.31 \pm 6.51 \mu\text{g}/\text{mg}$, teneur nettement supérieure à celle déterminée dans les extraits méthanolique de notre plante.

Ebrahimzadeh et *al.* (2010) ont étudié les teneurs des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la plante *Mentha spicata* qui donne des valeurs de l'ordre de $153.3 \pm 5.1 \text{ mg équivalent acide gallique}/\text{g}$ d'extrait et $11.0 \pm 0.31 \text{ mg équivalent quercetin}/\text{g}$ d'extrait pour les polyphénols et les flavonoïdes, respectivement.

Cette différence résulte vraisemblablement du fait que le dosage par le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés organiques non phénoliques peuvent réagir avec ce réactif comme dioxyde de soufre, acide ascorbique, les sucres, les amines aromatique, les acides organiques (Medina-Remón et *al.*, 2009). De même; le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que les facteurs climatiques, la maturité, les pratiques culturales et les conditions de stockage après la récolte (Bourgou et *al.*, 2008).

A notre connaissance et selon la bibliographie disponible, aucun résultat du dosage des flavonoïdes, flavones et flavonols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur les extraits de la plante *Mentha rotundifolia* pour pouvoir comparer nos résultats.

2.4. Analyse chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* est principalement composée de monoterpènes oxygénés à savoir l'oxyde de trans-pipéritène qui représente 66.39 % de l'huile totale. Ce composé est connu pour son effet insecticide (Teles et *al.*, 2013), anti nociceptif et antispasmodique (Souza et *al.*, 2009)

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Lorenzo et *al.* (2002) qui ont étudié la composition chimique de l'HE des parties aériennes de cette espèce provenant d'Uruguay; où le constituant majoritaire était l'oxyde de pipériténone 80,3%. Par contre, Derwich et *al.* (2010), on trouvé que le constituant majoritaire de l'HE de *M. rotundifolia* provenant du Maroc est le menthol (40.50%)

Brada et *al.* (2006) ont étudié la composition chimique de cette huile provenant de deux localités d'Algérie; les constituants majoritaires étaient l'oxyde de pipériténone (23.5 et 38.6%), oxyde de cis-pipéritone (28.1 et 30.5%) pour les régions de Rouina et Miliana, respectivement.

Cette différence dans les valeurs des composés ainsi que dans leur type est due probablement aux diverses conditions notamment l'environnement, l'origine géographique, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction (Laib, 2012), ainsi que les facteurs qui concernent la plante tels que le génotype et les stades de maturation (Shahat et *al.*, 2011).

2.5. Les activités biologiques

Les métabolites secondaires des plantes possèdent de multiples effets biologiques dont l'activité antioxydante, antimicrobienne, hypoglycémique, anti-carcinogénique (Stanković, 2011). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne.

2.5.1. L'activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant, parce que de nombreux métabolites actifs et divers mécanismes réactionnels sont impliqués dans le processus de stress oxydatif. Il n'y a pas une méthode commune par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement et de façon bien précise (Jindal et *al.*, 2012). Il est donc important d'utiliser plusieurs méthodes d'analyse et différents substrats pour évaluer l'efficacité des antioxydants (Gürsoy et *al.*, 2012).

Dans le présent travail; l'activité antioxydante des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été évaluée par quatre tests différents: L'effet piègeur du radical DPPH[•], le pouvoir réducteur, l'effet chélateur du fer ferreux et le test qualitatif du blanchissement de β - carotène.

➤ *Activité anti-radicalaire*

La méthode spectrophotométrique du piégeage du DPPH[•], est une procédure commune dans l'évaluation de l'activité antioxydante (Beyhan et *al.*, 2010). C'est une méthode, rapide et sensible (Gharib et de Silva, 2013). De même, le DPPH[•] est un radical stable à température ambiante (Yousef Ali, 2012). Le piégeage des radicaux de DPPH[•] par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes: (1) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques), (2) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Popovici et *al.*, 2009; Vladimir-Knežević et *al.*, 2010).

Du point de vue méthodologique; le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant les groupements SH[•], NH[•] et OH[•] (Popovici et *al.*, 2009).

Les résultats obtenus avec ce test montrent que la valeur d'IC₅₀ d'EMM est de l'ordre de 265,491 ± 2.221 µg/ml qui est significativement élevé par rapport à celle de EMS (133.160 ± 11.346 µg/ml), de même l'huile essentielle a montré une activité antioxydante avec une valeur d'IC₅₀ égale 1755 ± 0,006 µg/ml. Cette activité reste toujours très inférieure à celle du standard le BHA (20,701 ± 0.065 µg/ml).

Nos résultats ne concordent pas avec ceux enregistrés par Nickavar et *al.* (2008) qui ont étudié l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de quatre plantes médicinales du genre *Mentha* dont *Mentha rotundifolia* qui a donné une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 21.71 (19.90-23.67) µg/ml.

En revanche, dans une étude faite par Sarikurkcu et *al.* (2008) sur une plante de la famille Lamiaceae (*Marrubium globosum subsp. Globosum*); l'extraits méthanolique au Soxhlet a montré une valeur d'IC₅₀ de 157.26 ± 1.12 µg/ml qui est proche de notre résultat. De même l'huile essentielle a montré une IC₅₀ de 1203.38 ± 7.18 µg/ml.

Les travaux concernant l'évaluation de la capacité d'huile essentielle du genre *Mentha* de piéger le radical DPPH[•] exprimée par les valeurs d'IC₅₀, ont donné des résultats différents variant d'une espèce à une autre; à savoir *M. longifolia* ssp (IC₅₀ = 10700 ± 5.0 µg/ml) (Gulluce et *al.*, 2007), *M. piperita* (IC₅₀ = 60.41 ± 0.60 µg/ml) (Kizil et *al.*, 2010), *M. pulegium* (IC₅₀ = 6200 ± 0.2 µg/ml) (Teixeira et *al.*, 2012).

Cette différence dans les valeurs des IC₅₀ peut être attribuée à la différence dans la concentration de DPPH[•] utilisée dans le test et le temps d'incubation d'une part (Sharma et *al.*, 2009) et à l'influence

des autres facteurs intrinsèques et extrinsèques qui peuvent affecter la composition chimique des plantes d'autre part.

➤ *L'activité chélatrice du fer ferreux*

Les activités antioxydantes des composés phénoliques sont également attribuées à leur capacité de chélater les ions de métaux de transition tels que le fer et le cuivre (Vladimir-Knežević et al., 2011) qui jouent un rôle important dans les processus d'oxydation conduisant à la formation de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (Ebrahimzadeh et al., 2010) Les agents chélateurs peuvent inhiber la génération de radicaux en stabilisant les métaux de transition et par conséquent réduire les dommages des radicaux libres (Yumrutas et al., 2012).

Sivakumar et Meera, (2013) ont rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique. Parmi les différentes espèces d'ions métalliques; les ions ferreux (Fe^{2+}) sont les pro-oxydants les plus puissants (Beyhan et al., 2010) pour cela on les utilise comme indicateur de l'activité chélatrice de nos extraits. À la lumière des résultats obtenus dans ce test, les extraits méthanoliques exercent une activité chélatrice avec des doses élevées par rapport au standard EDTA. Par contre, l'huile essentielle n'a manifesté aucun effet chélateur vis-à-vis du Fe^{2+} dans les concentrations utilisées.

Ebrahimzadeh et al. (2010) ont révélé que l'extrait de la plante *Mentha spicata* obtenu par l'éthanol-eau (70-30 v/v) est capable de chélater les ions Fe^{2+} avec une valeur d' IC_{50} de $757.4 \pm 29.5 \mu g/ml$. Cette valeur est significativement inférieure à notre résultat, ceci peut être expliqué par la différence de la méthode d'extraction et la composition chimique des plantes. En revanche, notre résultat obtenu avec l'HE est en accord avec celui obtenu par Bounatirou et al. (2007); En effet ces derniers ont montré que l'huile essentielle de la plante *Thymus capitatus* (famille lamiaceae) n'exerce aucun effet chélateur ce qu'ils ont expliqué par la présence des composés monohydroxylés comme le carvacrol, incapables de former des complexes avec le Fe^{2+} .

➤ *Le pouvoir réducteur*

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante (Yumrutas et al., 2012) parce qu'il est lié à sa capacité de faire un don d'électrons à des espèces de radicaux libres et les réduire en une forme plus stable et non réactive (Osman, 2013). Les agents réducteurs peuvent également réduire les intermédiaires oxydés du processus de la

peroxydation lipidique (Sivakumar et Meera, 2013) donc ils peuvent réagir comme des antioxydants primaires et secondaires (Misra et Dey, 2012).

Les valeurs des CE₅₀ obtenues dans ce test montrent que les extraits méthanoliques et l'huile essentielle de *M. rotundifolia* possèdent une capacité réductrice importante mais elle est inférieure à celle du BHA (Tab. X), cette activité démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres.

Dans une étude faite par Sarikurkcu et *al.* (2008); les extraits de la plante *Marrubium globosum subsp. globosum* (Lamiaceae) a montré une capacité réductrice avec une valeur d'CE₅₀ égale à $4315.80 \pm 2.54 \mu\text{g/ml}$ et $625.63 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$ pour l'HE et l'extrait méthanoliques au Soxhlet respectivement. Cette activité est semble faible en comparaison de nos résultats.

➤ *Le test qualitatif du blanchissement du β -carotène*

La méthode de diffusion du blanchiment du β - carotène dans l'agar est une méthode simple et les résultats sont visuellement évidents. Elle est utilisée pour un screening initial des différents extraits de plantes pour leur pouvoir antioxydant (Belhattab, 2007).

Les résultats de ce test montrent que les extraits méthanoliques de *Mentha rotundifolia* possèdent un potentiel antioxydant important qui peut être dû aux polyphénols qui stabilisent le radical peroxyde par donation d'hydrogène. Par contre, l'huile essentielle a montré une activité faible.

Plusieurs chercheurs ont montré la capacité des plantes qui appartiennent au genre *Mentha* à inhiber la peroxydation lipidique par des tests spectrophotométriques utilisant le β carotène et l'acide linoléique (Gulluce et *al.*, 2007; Kanatt et *al.*, 2007; Kamkar et *al.*, 2010), ce qui est en accord avec nos résultats.

Les résultats obtenus dans ces tests montrent qu'il y a une relation dose - dépendante corrélation positive entre le potentiel antioxydant et la teneur en composés phénoliques des extraits méthanoliques ce qu'est en accord avec d'autres travaux (Aljadi et Kamaruddin; 2004; Lee et *al.*, 2011; Stagos et *al.*, 2012; Gourchala et *al.*, 2013). Toutefois, certaines équipes de chercheurs n'ont pas confirmé cette relation (Matkowski et *al.*, 2006; Boulanouar et *al.*,2013).

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent

différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (Athamena et *al.*, 2010).

Les composés phénoliques les plus antioxydants sont les flavonoïdes (Tapas et *al.*, 2008) et les acides hydroxycinamiques comme (p-coumarique, ferulique, chlorogénique, l'acide trans-cinnamique) (Bourgou et *al.*, 2009).

L'activité antioxydante des huiles essentielles pourrait être due aussi à la présence des composés phénoliques.

Dans une étude faite par Gharib et Silva. (2013) sur quatre plantes médicinales de la famille *Lamiaceae* a montré qu'il y a une corrélation positive entre les quantités des composés phénoliques dans les huiles essentielles et l'activité antioxydante.

Selon Bourgou et *al.*, (2008), les composés des huiles essentielles les plus efficaces dans l'activité antioxydantes sont les monoterpènes oxygénés en particulier les phénols et les alcools. Notre huile est riche en monoterpènes oxygénés essentiellement l'oxyde piperitenone ce qui peut expliquer leur activité antioxydante. En revanche d'après Djenane et *al.*, (2012) les huiles essentielles qui sont riche en composés non phénoliques ont également un pouvoir antioxydants.

Il faut noter que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Laib, 2012).

2.5.2. Activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle de la plante *Mentha rotundifolia* a été faite par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques (EMM et EMS) sont inactifs envers toutes les souches microbiennes testées.

A notre connaissance et selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux antérieurs sur l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques de la plante *Mentha rotundifolia*, pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres plantes. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Gulluce et *al.* (2007) qui ont constaté que l'extrait méthanolique de

la plante *Mentha longifolia* L.ssp. *longifolia* est inactif vis-à-vis de 38 microorganismes différents (bactéries, champignons et une levure). Par contre, l'huile essentielle a montré une activité importante envers tous les microorganismes testés.

De même, Adiguzel et al. (2009), ont étudié l'activité antimicrobienne d'une autre plante de la famille Lamiaceae (*Nepta qataria*) sur 40 microorganismes différents (24 bactérie, 15 champignons et une levure); l'extrait méthanolique de cette plante s'avère inactif envers 28 microorganismes dont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027, *Staphylococcus aureus* ATCC-29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC-176.

L'inactivité de nos extraits peut être due à l'absence des oligomères phénoliques. Selon karou et al. (2005) le mécanisme de toxicité des polyphénols vis-à-vis des microorganismes se fait soit par la privation des ions métalliques tel que le fer; soit par des interactions non spécifiques tels que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines) ou les enzymes. Cependant, un important facteur qui régit l'activité antimicrobienne des polyphénols est leur poids moléculaire, les monomères sont trop petits pour établir assez de pont hydrogènes tandis que les polymères de haut poids moléculaire sont trop grands pour traverser la paroi bactérienne, le poids moléculaire idéal serait donc celui des oligomères.

L'huile essentielle de la plante *Mentha rotundifolia* a montré une cytotoxicité envers toutes les souches étudiées mais avec des degrés différents, les champignons se sont révélés plus sensibles à cette huile que les bactéries. Cette différence dans la sensibilité des espèces microbiennes suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux effets de composants différents de l'huile essentielle.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de cette plante utilisant la technique de diffusion sur gélose a été adoptée par plusieurs équipes de chercheurs sans toutefois déterminer les CMI.

Les effets antimicrobiens manifestés par les HE de notre plante sont proches à ceux obtenus par Ladjel et al. (2011) sur la même espèce provenant d'Ouargla où l'huile essentielle a montré un pouvoir antimicrobien vis-à-vis d'*Escherichia coli* (24 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (11 mm). Cependant, Riahi et al. (2013) rapportent que l'HE de *Mentha rotundifolia* provenant de Tunisie possède des effets plus importants sur les bactéries que sur les champignons.

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles sont difficiles à attribuer à un composé spécifique à cause de leur complexité et variabilité. En général, l'activité antimicrobienne est

principalement expliquée par la présence de mono et sesquiterpènes avec des cycles aromatiques et des groupes hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons d'hydrogène avec les sites actifs des enzymes cibles (Rojas et *al.*, 2007).

Selon Hassane et *al.* (2011); les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques et médicinales est attribuées à leur profil chimique et surtout aux alcools terpéniques; notre huile est riche en ces composés tels que 1,8-Cineole, 1-Nonen-3-ol, 1-Borneol, 4-Terpineol, 1-Octen-3-ol. De même, les effets synergiques des constituants majeurs et mineurs présents dans les huiles essentielles doivent être pris en considération pour expliquer leur activité biologique (Mecciaa et *al.*, 2007), l'effet antagoniste lui-même peut affecter l'activité antimicrobienne. Selon Wright et *al.* (2007) le γ -terpinene et le p-cymene sont capable de réduire l'effet antibactérien du terpinen-4-ol. Ces derniers sont présents dans l'HE de *Mentha rotundifolia*, ce qui peut expliquer leur activité moyenne sur les bactéries.

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles peuvent inhiber les micro-organismes impliquent différents modes d'action et en partie peut-être en raison de leur caractère hydrophobe. En conséquence, elles sont imbriqués dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, les rendant plus perméable, ce qui conduit à la fuite du contenu des cellules vitales, la dépréciation des systèmes enzymatiques bactériens peut aussi être un mécanisme d'action potentiel (Edris, 2007). De même, pour les champignons un nombre d'effets et d'hypothèses ont été rapportés: il s'agit notamment de l'inhibition de: la sporulation, la germination, allongement des hyphes et la perturbation des parois et les membranes cellulaires (Cavanagh et *al.*, 2007).

Il existe des preuves dans la littérature que les bactéries à Gram positives sont plus sensibles à l'huile essentielles de certaines plantes que les bactéries à Gram négatif (Rojas et *al.*, 2007; Nikšić et *al.*, 2012). Cependant, les résultats de cette étude ont montré que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* n'a aucune activité antibactérienne sélective.

Ce résultat est en accord avec celui de Gulluce et *al.* (2007); la présence de forte teneurs en cis-pipéritone époxyde (18,4%), pulégone (15,5%) et d'oxyde de pipéritènone (14,7%) rend l'HE de *Mentha longifolia L.ssp. longifolia* non sélectif.

La bactérie *P. aeruginosa* développe une résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques, par la production d'enzymes inactivant les antibiotiques et / ou l'altération de sites cibles des B- lactamines et certains groupes d'aminosides et la faible perméabilité de la membrane externe (Sahu et *al.*, 2012). De même, en bibliographie, il est à noter que nombreux chercheurs ont rapporté l'effet

antimicrobiens des HE. Cependant, *P. aeruginosa* développe généralement une résistance (Khalighi-sigaroodi et *al.*, 2005, Meccia et *al.*, 2007) . Par contre, dans notre étude cette souche a apparue sensible à l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, ce qui peut être expliqué par la présence de composés capables de traverser la membrane externe ou affecter sa perméabilité.

➤ Conclusion et perspectives

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits méthanoliques obtenu par macération et au Soxhlet et de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation des parties aériennes de *Mentha rotundifolia*.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence: des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes, des quinones dans les extraits méthanoliques de la plante, et absence des saponines et des anthraquinones.

Les rendements des extractions ainsi que les teneurs des extraits méthanoliques en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols s'avèrent importants pour l'extrait méthanolique au Soxhlet que pour l'extrait méthanolique obtenu par macération.

L'analyse de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a permis d'identifier 43 constituants dominée par les monoterpènes oxygénés, avec comme constituant majoritaire l'oxyde de trans-pipéritène (66,39%).

Quatre méthodes ont été suivies pour déterminer l'activité antioxydante des extraits de la plante: l'effet piègeur du radical DPPH, le pouvoir réducteur, l'effet chélateur du fer ferreux, et le test qualitatif du blanchissement de β - carotène. Les extraits méthanoliques montrent un effet antiradicalaire (DPPH) et un pouvoir réducteur plus importants que l'effet chélateur du fer ferreux.

L'huile essentielle a manifestée un pouvoir antiradicalaire et réducteur considérable en revanche le test de du blanchissement du β - carotène et elle est inactive dans le test du chélation du fer ferreux.

Une corrélation positive entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits méthanoliques a été observée. L'activité de l'huile essentielle suggère la contribution d'autres composés non phénolique dans cette activité.

En outre, seule l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a montré une activité antimicrobiennes relativement moyenne vis-à-vis toutes les souches bactérienne testés et très forte pour les champignons. Tandis que, les extraits méthanoliques ne possèdent aucuns effets antimicrobiens vis-à-vis de toutes les souches testées.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour mieux cerner l'activité antioxydante des extraits de cette plante. De même, il est important d'identifier les molécules responsables des ces effets afin d'élucider leur mécanisme d'action en vue de supplanter les substances synthétiques utilisées en thérapeutique ou en industrie

Références bibliographiques

1. Abdulla A., Zhao X. and Yang F. (2013). Natural polyphenols inhibit lysine-specific demethylase-1 *in vitro*. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research* **1(1)**: 56-63.
2. Adamczyk B., Kitunen V. and Smolander A. (2013). Response of soil C and N transformations to condensed tannins and different organic N-condensed tannin complexes. *Applied Soil Ecology* **64**: 163-170.
3. Adiguzel A., Ozer H., Sokmen M., Gulluce M., Sokmen A., Kilic H., Sahin F. and Baris O. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. *Polish journal Microbiology* **58(1)**: 69-76.
4. Ahmed M., Khan M. I., Khan M. R., Muhammad N., Khan A.U. and Ali Khan R. (2013). Role of medicinal plants in oxidative stress and cancer. *Open Access Scientific Reports* **2(2)**: 1-3.
5. Aires A., Marques E., Carvalho R., Rosa E. A. S. and Saavedra M. J. (2013). Evaluation of biological value and appraisal of polyphenols and glucosinolates from organic baby-leaf salads as antioxidants and antimicrobials against important human pathogenic bacteria. *Molecules*. **18**: 4651- 4668.
6. Albayrak S., Aksoy A., Albayrak S. and Sagdic O. (2013). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science & Technology* **A1**: 1-9.
7. Ali M., Abbasi B. H. and Ul-haq I. (2013). Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products* **49**: 400-406.
8. Aljadi A.M. and Kamaruddin M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* **85**: 513-518.
9. Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K. and Gallagher E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry* **119**: 770-778.
10. Alwash M. S., Ibrahim N. and Ahmad W. Y. (2013). Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* linn leaves. *American Journal of Infectious Diseases* **9(2)**: 46-58.
11. Andro A. R., Atofani D., Boz I., Zamfirache M., Burzo I. and Toma C. (2011). Studies concerning the histology and biochemistry of *Mentha Longifolia* (L.) Huds. During vegetative Phenophase. *Analele științifice ale Universității Al. I. Cuza" Iași* (2): 25-30.
12. Arijit S. and Arpita B. (2013). Documentation of some ethno-medicinal plants of family Lamiaceae in bankura district, West Bengal, India. *International Research Journal of Biological Sciences* **2(6)**: 63-65.
13. Arribas A. S., Martínez-Fernández M., Moreno M., Bermejo E., Zapardiel A. and Chicharro M. (2013). Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric. *Food Chemistry* **136**: 1183–1192.
14. Asgarpanah J. and Kazemivash N. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrum sativum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **6(31)**: 2340-2345.
15. Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. and Khebri S. (2010). Activite anti- oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* l. *Lebanese Science Journal* **11(1)**: 69-81.

16. Bagre I., Bahi C., Gnahoue G., Djaman A. J and Guede G F. (2007). Composition phytochimique et evaluation in vitro de l'activite antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (baker) milne-redhead (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *J. sci. pharm. biol* **8(1)**: 15-23.
17. Bakhouch A., Lozano-Sánchez J., Beltrán-Debón R., Joven J., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. (2013). Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequin extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Research International* **50**: 401–408.
18. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 446–475.
19. Balasuriya B. W. N and Rupasinghe H. P. V. (2011). Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease* **5**:172-188.
20. Bargagli E., Olivieri C., Bennett D., Prasse A., Mullerquernheim J. and Rottoli P. (2009). Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med* **103**: 1245-1256.
21. Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M. and Fereira I.C.R. (2010). Lamiaceae often used in portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *Food Science and Technology* **43**: 544-550.
22. Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C. A. T., Kabore Z. and Traore S. A. (2001). Composition chimique et activités antibacteriennes des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *Cymbopogon proximus* (stapf.) et *d'Ocimum canum* (sims). *Pharm. Méd.Trad AF II*: 37-51.
23. Batool F., Sabir S. M., Rocha J. B .T., Shah H A, Saify Z. S and Ahmed S. D. (2010). Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: a commonly used spice from Pakistan. *Pak. J. Bot* **42(6)**: 4299-4311.
24. Beaudeau J. L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. and Peynet J.(2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* **21**:144–150.
25. Belhattab R. (2007). Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxigène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf. et *Marrubium vulgare* L (famille des Lamiaceae). *Thèse de doctorat d'état Dépt Biologie, UFA Setif.*
26. Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou D. and Exarchou V. (2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir* **2**: 63-69.
27. Belhattab R., Larous L., Fgueirido A.C., Santos P. A. G., Costa M.M., Barroso J. G., and Pedro L.G. 2006. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. Growing wild in Algeria. *J. Essent.Oils Res* **18**: 369-373.
28. Benayad N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V – Agdal, Maroc. 1-59.
29. Beyhan O., Elmastas M. and Gedikli F. (2010). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* **4(11)**: 1065-1072.
30. Bichra M, El modafar C, El boustani E and Benkhalti F. (2012). Antioxidant and anti-browning activities of *Mentha suaveolens* extracts. *African Journal of Biotechnology* **11(35)**: 8722-8729.

31. Bimakr M., Abdul Rahman R., Taip F. S., Ganjloo A., Salleh L., Selamat J., Hamid A., I.S.M. and Zaidul I.S.M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing* **89**: 67–72.
32. Bojić M., Debeljak Ž., Tomičić M., Medić-Šarić M. And Tomić S. (2011). Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal*. **10**: 1-8.
33. Borrego S., Vazquez A., Dasí F., Cerdá C., Iradi A., Tormos C., Sánchez J.M., Bagán L., Boix j., Zaragoza C., Camps J. and Sáez G. (2013). Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dg) as a possible tumor marker. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 3467-3486.
34. Boulanouar B., Abdelaziz G., Aazza S., Gago G., Graç M. and Miguel M. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products* **46**: 85– 96.
35. Bounatirou S., Smiti S., Miguel M. G., Faleiro L., Rejeb M. N., Neffati M., Costa M. M., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G. (2007). Chemical composition antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff.et Link. *Food Chemistry* **10**: 5146–155.
36. Bourgou S., Ksouri' R., Skandranf I., Chekir-Ghedira L. and Marzouk B. (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of the essential oil and methanol extract from tunisian *nigella sativa* l. (ranunculaceae). *Italian Journal of Food Science* **20**: 191-201.
37. Brada M., Bezzina M., Marlier M., Annabelle Carlier A. and Lognay G. (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **11(1)**: 3-7.
38. Brada M., Bezzina M., Marlier M. and Lognay G. C. (2006). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* **18**: 663-665.
39. Brunetti C., Ferdinando M., Fini A., Pollastri S. and Tattini M. (2013). Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 3540-3555.
40. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-253.
41. Capasso A. (2013). Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules* **18**: 690-700.
42. Cardenas-Rodriguez N., Huerta-Gertrudis B., Rivera-Espinosa L., Montesinos-Correa H., Bandala C., Carmona-Aparicio L. and Coballase-Urrutia E. (2013). Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 1455-1476.
43. Cavanagh H M. A. (2007). Antifungal activity of the volatile phase of essential oils: a brief review. *Natural product communications* **2(12)**: 1297-1302.
44. Chae S. C., Lee J. and Park S. U. (2013). Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *EXCLI Journal* **12**: 225-230.
45. Chakraborty I., Sanjoy Kunti S., Bandyopadhyay M., Dasgupta A., Chattopadhyay G. D. and Chakraborty S. (2007). Evaluation of serum zinc level and plasma sod activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **22(2)**: 109-113.
46. Challacombe C. A., Abdel-Aal E. M., Seetharaman K. and Duizer L. M. (2012). Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. *Journal of Cereal Science* **56**: 181-188.

47. Chang Y., Yang C., Sun R., Cheng Y., Kao W. and Yang P. (2013). Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Scientific reports*. **3**: 1-7.
48. Chen H. J., Inbaraj B. S. and Chen B. H. (2012). Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum Kitam* by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column derivatization technique. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 260-285.
49. Costa F, Yendo A .C. A., Fleck J. D., Gosmann G. and Fett-Neto A. G.(2013). Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **66**: 56-62.
50. Couic-Marinié F. and Lobstein A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* **525**: 12-21.
51. Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* **12 (4)**: 564-582.
52. Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. **23**: 174-181.
53. David M. Z., Daum R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews* **23(3)**: 616-687.
54. Del Rio L. A. (2011). Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **506**: 1-11.
55. DeMarchi E., Baldassari F., Bononi A., Wieckowski M. R. and Pinton P. (2013). Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66shc and protein Kinase C. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2013**: 1-11.
56. Denslow M.W. and Poindexter D. B. (2009). *Mentha suaveolens* and *M. rotundifolia* in north Carolina: a clarification of distribution and taxonomic identity. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* **3(1)**: 383-389.
57. Derwich E., Benziane Z., Taouil R., Senhaji O. and Touzani M. (2010). Comparative essential oil composition of leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a traditional herbal medicine in Morocco. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* **4(1)**: 47-54.
58. Derwich E., Chabir R., Taouil R. and Senhaji O. (2011). *In-vitro* antioxidant activity and GC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* **3(2)**: 130-136.
59. Devasagayam T. B. A., Tilak J. C., Bolor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S. and Lele R. D. (2004). Free radical and antioxidants in human health: current status and future prospects. *JAPI* **52**: 794-804.
60. Djenane D., Aïder M., Yangüela J, Idir L., Gómez D. and Roncalés P. (2010). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science* **92**: 667-674.
61. Dóka O., Ficzek G., Bicanic D., Spruijtc R., Luterotti S., Tóth M., Buijnsters G. J. and Végvári G. (2011). Direct photothermal techniques for rapid quantification of total anthocyanin content in sour cherry cultivars. *Talanta* **84**: 341-346.
62. Dong Woo H. and Kim J. (2013). Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World Journal Gastroenterol* **19 (7)**: 1011-1019.

63. Duran-Bedolla J., Rodriguez M. H., Navor V. S., Arancibia S. R., Cerbon M. and Rodriguez M. C. (2013). Oxidative stress: production in several processes and organelles during *Plasmodium* sp development. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2(2)**: 93-100.
64. Ebrahimzadeh M. A., Nabavi S. M. and Nabavi S. F. (2010). Biological activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacology online* **1**: 841-848.
65. Edris A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. *Phytotherapy research*. DOI: 10.1002/ptr.
66. Eisenreich W., Rohdich F. and Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *TRENDS in Plant Science* **6(2)**: 78-84.
67. Ekren S., Yerlikaya O., Tokul H. E., Aslı Akpınar A. and Açu M. (2013). Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *African Journal of Microbiology Research* **7(5)**: 383-388.
68. El Arch M., Satrani B., Farah A., Bennani L., Boriky D., Fechtal M., Blaghen M. and Talbi M. (2003). Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc. *Acta Botanica Gallica* **50(3)**: 267-274.
69. Erum S., Naemullah M. and Masood S. (2012). Phenotypic variation among *Mentha* spp. *Pakistan J. Agric. Res* **25(1)**: 55-61.
70. Faller A. L. K., Fialho E. (2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional Plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**: 561–568.
71. Favier. A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 108-115.
72. Ferguson L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **475**: 89–111.
73. Fransen M., Nordgren M., Wang B. and Apanasets O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/ RNS-metabolism: implication of human disease. *Biochemica et Biophysica Acta* **1822**: 1363-1373.
74. Gallagher K. A., Fenical W and Jensen P. R. (2010). Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 794-800.
75. Gardés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. and Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actualité Chimique*: 91-96.
76. Gebreyohannes G., Moges F., Sahile S., Raja N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed.* **3(6)**: 426-435.
77. Ge M., O'Reilly A., Baillie N., Twentyman G., Sturt J., Fitzpatrick M. and Taylor T. (2008). Vitamin C: Evidence, application and commentary. *Original Scientific Paper* **35(5)**: 312-318.
78. Georgé S., Brat P., Alter P. and Amiot M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**:1370-1373
79. Gharib F.A. L and Silva J. A. T. (2013). Composition, Total phenolic content and antioxidant activity of the essential of four Lamiaceae herbs. *Medicinal and Aromatic Plant Science Biotechnology* **7(1)**: 19-27.

80. Gholivand M. B., Rahimi-Nasrabadi M., Batooli H. and Ebrahimabadi A. H. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton Canescens*. *Food chemical toxicology* **48**: 24-28.
81. Gourchala F. and Henchiri C. (2013). Study of the effect of dates on blood glucose and lipid profile in healthy human subjects. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences* **3(3)**: 826-833.
82. Goze I., Alim A., Tepe A S., Sokme M, Sevgi K. and Tepe B. (2012). Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* **3(4)**: 246-254.
83. Grassi D., Desideri G. and Ferri C. (2010). Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* **2**: 889-902.
84. Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. and Ozkan H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry* **103**: 1449-1456.
85. Gürsoy N., Tepe B. and Akpulat H. A. (2012). Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Bentham) and *S. ceratophylla* (L.). *Records of natural products* **6(3)**: 278-287.
86. Gutha L. R., Casassa L. F., Harbertson J. F. and Naidu R. A. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway Genes and anthocyanins due to virus infection in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology* **10 (187)**: 1-18.
87. Hafsé M., Benbrahim K. F., Abderrahim Saidi A. and Farah A. (2013). Volatile Components and Antibacterial Profile of Essential Oils Extracted from Leaves and Twigs of *Pistacia lentiscus* L. *British Microbiology Research Journal* **3(4)**.
88. Hannan A., Karan S. and Chatterjee T. K. A. (2012). Comparative Study Of In-Vitro Antioxidant Activity Of Different Extracts Of Areca Seed Collected From *Areca Catechu* Plant Grown In Assam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4(2)**: 420-427.
89. Heleno S. A., Ferreira I. C. F. R., Esteves A. P., Ciric A., Glamoclija J., Martins A., Sokovic M. and Queiroz M. J. R. P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology* **58**: 95-100.
90. Hendriks h. and Van Os F. H. L. (1976). Essential oil of two chemotypes of *Mentha suaveolens* during ontogenesis. *Phytochemistry* **15**: 1127-1130.
91. Höhn A., König J. and Grune T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of proteomics*. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004).
92. Hossain M. B., Brunton N. P., Barry-Ryan C., Martin-Diana A. B. and Wilkinson M. (2008). Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan J. Chem.* **1(4)**: 751-756.
93. Humadi S. S and Istudor V. (2008). Quantitative analysis of bio-active compound in *Hibiscus sabdariffa* L. Extracts note I quantitative analysis of flavonoids. *Farmacia* **6**: 699-707.
94. Hwang O. (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology* **22(1)**: 11-17.

95. Ivanov A. V., Bartosch B., Smirnova O. A., Isaguliants M. G. and Kochetkov S. N. (2013). HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses* **5**: 439-469.
96. Iriti M. (2013). Plant neurobiology, a fascinating perspective in the field of research on plant secondary metabolites. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 10819-10821.
97. Jash S. K and Brahmachari G. (2013). Recent progress in the research of naturally occurring flavonoids: A look through. *Signpost Open Access J Org Biomol Chem.* **1**: 65-168.
98. Jayasena T., Poljakb A., Smytheb G., Braidya N., Münchd G., Sachdeva P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Research. Reviews.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2013.06.003>.
99. Jena N. R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Bioxi* **37(3)**: 503-517.
100. Jimenez P. N., Koch G., Thompson J. A., Xavier K. B, Cool R. H. and Quax W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76(1)**: 46-65.
101. Jindal H. M. K. and Mohamad J. (2012). Antioxidant Activity of *Ardisia crispa* (Mata pelanduk). *Sains Malaysiana* **41(5)**: 539-545.
102. Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S., Traoré A. S. (2005). Activité antioxydantes et antibacteriennes des polyphenols extraits de plantes medicinales de la pharmacopee traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des Procédés en vue d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments, Utilisation des OGM, Analyse des risques en agroalimentaire. *Université de Ouagadougou*.
103. Kaushal N. and Kudva A. K. (2013). Oxidative stress and inflammation: "the lesser of two evils" in carcinogenesis. *Journal of Postdoctoral Research* **1(2)**: 89-101.
104. Kawsar S. M. A., Hug E., Nahar N. and Ozeki Y. (2008). Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by reversed phase – HPLC. *American journal of plant physiology* **3(4)**: 165-172.
105. Kay C. D., Hooper L., Kroon P. A., Rimm E. B., and Cassidy A. (2012). Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: Asystematic review of Randomized controlled trials of flavonoid – rich food products. *Mol. Nutr. Food Res* **00**: 1-12.
106. Khadraoui A., Khelifa A., Hamitouche H. and Mehdaoui R. (2013). Inhibitive effect by extract of *Mentha rotundifolia* leaves on the corrosion of steel in 1MHCl solution. *Res Chem Intermed.* DOI: 10.1007/ s 11164-012-1014-y.
107. Khaldi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H. (2012). Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement *in vitro* des moisissures. *European Journal of Scientific Research* **80(3)**: 311-321.
108. Khalighi-Sigaroodi F., Hadjiakhoondi A., Shahverdi A. R., Mozaffarian V. A. and Shafiee A. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ferulago bernardii tomk.* And *M. pimen.* *DARU* **13(3)**: 101-104.
109. Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Srivastava A. and Kumar S. (2000). Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica* **111**: 121–125.
110. Khoddami A., Wilkes M. A. and Roberts T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**: 2328-2375.

111. Kim M. H., Bae S., Kim Y., Cho C., Kim S. J., Kim Y., Lee S., Kim H., Hwang Y., Kang J. S. and Lee W. J. (2013). Vitamin C prevents the stress-induced damages on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through the down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- α and ROS production in Gulo(-/-) Vit C-Insufficient. *Free radical biology and medicine*. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.023](http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.023).
112. Kizil S., Hasini N., Tolan V., Kiliç E. and Yüksel U. (2010). Mineral content, essential oil components and biological activity of two *Mentha* species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops* **15(2)**: 148-153.
113. Kliebenstein D. J. (2012). Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 1-6.
114. Kocsy G., Tari I., Vanková R., Zechmann B., Gulyás Z., Poór P. and Galiba G. (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.004>.
115. Kohen R. and Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology* **30(6)**: 620-650.
116. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knezevic S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm* **54**: 65-72.
117. Kothe H.W. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed *terres*. pp: 201.
118. Krook M. A. and Hagerman A. E. (2012). Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International* **49**: 112-116.
119. Kuka S., Tatarkova Z. and Kaplan P. (2012). Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta Medica Martiniana* **12(1)**: 5-11.
120. Kusano C. and Ferrari B. (2008). Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and Molecular Biology* **7(1)**: 1-15.
121. Ladjel 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.
122. Laib I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs. *Nature & Technologie* **7**: 44 -52.
123. Lamina S., Ezema C. I., Theresa A. I. and Anthonia E. U. (2013). Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2(2)**: 83-91.
124. Lawrence B. M. 2007. Mint: The genus *Mentha*. Medicinal and aromatic plants- industrial profiles. *CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL*. pp 4.
125. Le K., Chiu F. and Ng K. (2007). Identification quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food chemistry* **105**: 353-363.
126. Lee C., Chen L., Chang T., Ke W., Lo Y. and Wang C. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry* **124**: 833-841.

- 127.Lee D, Yoon M. H., Kang Y. P., Yu J., Park J. H., Lee J., Kwon S. W. (2013). Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. *Food Chemistry* **141**: 3931–3937.
- 128.Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F. and Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* **102**: 771-776.
- 129.Liochev S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* **60**: 1-4.
- 130.Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R. and Congueal S. (2002). Essential oils of *Mentha plegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian archives of biology and technology* **45(4)**: 519-524.
- 131.Luthria D. L., Mukhopadhyay S. and Krizek D. T. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**: 771-777.
- 132.Ma P., Wu Y., Zeng Q., Gan Y., Chen J., Ye X. and Yang X. (2013). Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and Chemical Toxicology* **58**: 177-183.
- 133.Mahmoud A., Zahran W. A., Hindawi G. R., Labib A. Z. and Galal R. (2013). Prevalence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in Egypt, with special reference to typing methods. *Journal of Virology & Microbiology* **2013**: 1-13.
- 134.Mahmoudi S., khali M. and Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie* **9**: 35-40.
- 135.Malik F., Hussain S., Sadiq A., Parveen G., Wajid A., Shafat S., Channa R. A., Mahmood R, Riaz H., Ismail M. and Raja F.Y. (2012). Phyto-chemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **6(9)**: 613-619.
- 136.Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., and Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**: 727-747.
- 137.Matkowski A. and Piotrowska M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* **77**: 346-353.
- 138.McCarthy A. L., O'Callaghan Y. C., Neugart S., Piggott C. O., Connolly A., Jansen M. A. K, Krumbein A., Schreiner M., FitzGerald R. J. and O'Brien N. M. (2013). The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers'spent Grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSGs Antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry* **141**: 2567-2574.
- 139.Méar J. B., Kipnis E., Faure E., Dessein R., Schurtz G., Faure K., Guery B. (2013). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association?. *Médecine et maladies infectieuses* **43**: 146-151.
- 140.Meccia G., Rojas L. B., Velasco J., Díaz T. and Usubillaga A. (2007). Composition and antibacterial screening of the essential oils of leaves and roots of *Espeletiopsis angustifolia* cuatrec. *Natural product communications* **2(12)**: 1221-1224.
141. Meda N. T. R., Bangou M. J., Bakasso S., Millogo-Rasolodimby J. and Nacoulma O.G. (2013). Antioxidant activity of phenolic and flavonoid fractions of *Cleome gynandra* and *Maerua angolensis* of Burkina Faso. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **3(2)**: 36-42.

142. Medina-Remón A., Barrionuevo-González A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martínez-González M. A., Diez-Espino J. and Lamuela-Raventos R. M. (2009). Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta* **634**: 54-60.
143. Milenkovic D., Jude B. and Morand C. (2013). miRNA as molecular target of polyphenols under lying their biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.046i>.
144. Mima A. (2013). Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: New Insights on Its Inhibition as New Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*. **2013**: 1-8.
145. Misra B. B. and Dey S. (2012). Phytochemical analyses and evaluation of antioxidant efficacy of *in vitro* Callus Extract of East Indian Sandalwood Tree (*Santalum album L.*) *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **1(3)**: 7-16.
146. Moutinho C. (2013). Antispasmodic activity of aqueous extracts from *Mentha piperita* native from Trás-os-Montes region (Portugal). *International Journal of Indigenous Medicinal Plants* **29(1)**: 1167-1174.
147. Nawaz H., Shi J., Mittal G. S., Kakuda Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultra filtration. *Separation and Purification Technology* **48**: 176-181.
148. Niciforovic´ N., Mihailovic´ V., Maškovic´ P., Solujic´ S., Stojkovic´ A., Pavlovic´ D. and Muratspahic´ D. (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 3125-3130.
149. Nickavar B, Alinaghi A and Kamalinejad M. (2008) Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **7(3)**: 203-209.
150. Nikšić H, Kovač-Bešović E, Makarević E, Durić K. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha longifolia (L.)* Huds. essential oil. *Journal of Health Sciences*. **2(3)**: 192-200.
151. Okuda T. and Ito H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules* **16**: 2191-2217.
152. Olmedo R. H., Nepote V. and Grosso N. R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology* **53**: 409-417.
153. Olszewska M. A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P. and Kicel A. (2010). Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus sensu stricto*. *Molecules* **15**: 8769-8783.
154. Orhan E. I, Senol F. S., Ercetin T., Kahraman A., Celep F., Akaydin G., Sener B., and Dogan M. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Industrial Crops and Products* **41** (2013) 21-30.
155. Osman I. H. (2013). *In Vitro* Antioxidant activity of *Mentha pulegium* from Saudi Arabia. *Bioscience Research* **10(1)**: 33-37.
156. Pallauf K., Bendall J. K., Scheiermann C., Watschinger K., Hoffmann J., Roeder T. and Rimbach G. (2013). Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food and Chemical Toxicology* **58**: 255-263.
157. Papas A. M. (2008). Vitamin E: A new perspective. *Nutri news*. **9(1)**: 1-7.

158. Penna C., Mancardi D., Rastaldo R. and Pagliaro P. (2009). Cardioprotection: A radical view free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**: 781-793.
159. Pérez-Pérez E., Vit P. and Huq F. (2013). Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine* **1(4)**: 63-72.
160. Pino J. A., Rosado A. and Fuentes V. (1999). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* **11**: 241-242.
161. Pizza V., Iorio E. and Capasso A. (2013). Parkinson's disease and oxidative stress: evaluation by BAP and d-ROMs tests. *Pharmacologyonline* **1**: 34-38.
162. Plazonić A., Bucar F., Maleš Ž., Mornar A., Nigović B and Kujundžić N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*caucalis platycarpus l.*), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* **14**: 2466-2490.
163. Popovici C., Saykova I. and Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* **4**: 25-39.
164. Proestos C., Lytoudi K., Mavromelanidou O. K., Zoumpoulakis P. and Sinanoglou V. J. (2013). Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants* **2**: 11-22.
165. Quezel P. and Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifique: Paris (France), pp. 34, 132.
166. Qusti S. Y., Abo-khatwa A. N. and Bin Lahwa M. A. (2010). Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *ejbs* **2(1)**: 40-51.
167. Rajesh K., Swamy A.H.M V., Inamdar S.S., Joshi V. and Kurnool A.N. (2013). Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of mentha arvensis leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *International Journal of PharmTech Research* **5(2)**: 426-430.
168. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* **23(4)**: 519-534.
169. Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., Hnia Chograni H., Yosr Zaouali Y., Nejja Zoghalmi N. and 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.
170. Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M. C., Michael I., Fatta-Kassinos D. (2013). Urban Wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*. **447**: 345–360.
171. Roberts C. K. and Sindhu K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* **84**: 705–712.
172. Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. and Khalel K. I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* **43**: 827-831.
173. Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guillard J. C., Lorgis L., Cottin Y. and Vergely C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacology & Therapeutics*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.004>.

174. Rodrigues L., Póvoa O., Teixeira G., Figueiredo A. C., Moldão M. and Monteiro A. (2013). Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products* **43**: 692-700.
175. Rodríguez-Rojas A., Rodríguez-Beltrán J., Couce A., Blázquez J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. **303**: 293–297.
176. Rofi'i A., Fatchiyah F., Rahayu P., Muhyi R., Sumitro S. B. (2013). Reactive oxygen species, NF- κ B, and p53 levels in tissue of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. **2(2)**: 143-147.
177. Rojas J., Velasco J., Rojas L. B., Díaz T., Carmonac J. and Morales A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* pers. and *B. prunifolia* H. B. &K. (Asteraceae). *Natural product communications*. **2(12)**: 1245 -1248.
178. Sahu M C., Debata N. K. and Padhy R. N. (2012) Antibacterial activity of Argemone mexicana L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S800 - S807.
179. Sanders T and Emery P. (2003). Molecular basis of human nutrition. Ed: *Taylor & Francis*. pp: 7,107.
180. Šarić-Kundalić B., Fialová S., Dobeš C., Ölzant S., Tekel'ová D., Grančai D. and Reznicek G. and Saukel J. (2009). Multivariate numerical taxonomy of *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Scientia Pharmaceutica*. **77**: 852-876.
181. Sarikurkcü C., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. and Harmandar M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology* **99**: 4239-4246.
182. Šarić-Kundalić B., Fialová S., Dobeš C., Ölzant S., Tekel'ová D., Grančai D., Reznicek G., Saukel J. (2009). Multivariate numerical taxonomy of *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Scientia Pharmaceutica* **77**: 851-876.
183. Savini I., Catani M. V., Evangelista D., Gasperi V. and Avigliano L. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 10497-10538.
184. Schmidt L., Belov V. N. and Goen T. (2013). Sensitive monitoring of monoterpene metabolites in human urine using two-step derivatization and positive chemical ionisation–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.046>.
185. Senevirathne M., Kim S. H., Siriwardhana N., Ha J. H., Lee K. W. and Jeon Y. J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Tech Int* **12(1)**: 27-38.
186. Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S. and Nacro M. (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des Sciences*. **10 (2)**: 24-32.
187. Shacter E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews* **32(3&4)**: 307-326.
188. Shahat A. A., Ibrahim A.Y., Hendawy S. F., Omer E. A., Hammouda F. M, Abdel-Rahman F. H. and Saleh M. A. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* **16**: 1366-1377.

189. Sharma O. P. and Bhat T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* **113**: 1202-1205.
190. Shin S. M., Yang J. H., and Ki S. H. (2013). Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2013**: 1-9.
191. Shimizu B. 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.
192. Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 152-177.
193. Sivakumar C. H. V. and Meera I. (2013). Antioxidant and Biological Activities of Three Morphotypes of *Murraya koenigii* L. from Uttarakhand. *Food Processing & Technology* **4(7)**: 1-7.
194. Sivananthan M. (2013). Antibacterial activity of 50 medicinal plants used in folk medicine. *Int. J. Biosci.* **3(4)**: 104-121.
195. Soares C, Calado T. and Venâncio A. (2013). Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Rev Iberoam Micol* **30(1)**: 9-13.
196. Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Aristidis M., Tsatsakis A. M. and Kouretas D. (2013). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 4115–4124.
197. Stanković M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal Science* **33**: 63-72.
198. Subedi A., Amatya M. P., Shrestha T. M., Mishra S. K. and Pokhrel B. M. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of methanolic extract of *Machilus odoratissima*. *Kathmandu university journal of science, engineering and technology* **8(1)**: 73-80.
199. Tapas A. R., Sakarkar D. M. and Kakde R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* **7(3)**: 1089-1099.
200. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N. R., Nogueira J. M. F., Saraiva J. A. and Nunes M. L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products* **36**: 81–87.
201. Teles S, Pereira J. A, Santos C. H. B., Menezes R. V., Malheiro R., Lucchese A. M., Silva F. (2013). Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha villosa* Hudson leaves. *Industrial Crops and Products* **46**: 1-7.
202. Tenover F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine.* **119 (6A)**: S3-S10.
203. Tholl D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological Roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 297-304.
204. Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* **1(1)**: 98-106.

205. Troppens D. M., Chu M., Holcombe L. J., Gleeson O., O’Gara F., Read N. D. and Morrissey J. P. (2013). The bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function and affects calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **56**: 135–146.
206. Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1246.
207. Ullah N., Khurram M., Ali Khan F., Umar Khayyam S., Amin M. U., Ullah S., Najeeb U., Muhammad S., Hussain J. and Khan M. A. (2011). Estimation of phytochemicals and antimicrobial activities of *Mentha spicata* from southern districts of KPK. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **01(07)**: 81-84.
208. Umemoto K. (1998). Two New Stereoisomers of 1, 2- Epoxymenthyl acetate from self- pollinated plant oils of *Mentha rotundifolia*. *Natural Product Letters* **11**:161-165.
209. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 44-84.
210. Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Štefan M. B., Alegro A., Kőszegi T. and Petrik J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules* **16**: 1454-1470.
211. Vijayalakshmi R. and Ravindhran R. (2012). Preliminary comparative phytochemical screening of root extracts of *Diospyrus ferrea* (Wild.) Bakh and *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schultes. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2(5)**: 581-587.
212. Wright B. S, Bansal A, Moriaritya D. M, Takaku S and Setzer W. N. (2007). Cytotoxic leaf essential oils from neotropical lauraceae: synergistic effects of essential oil components. *Natural product communications*. **2** (12): 1241-1244.
213. Wojakowska A., Piasecka A., García-López P. M., Zamora-Natera F., Krajewski P., Marczak Ł., Kachlicki P. and Stobiecki M. (2013). Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican Lupine species using LC–MS techniques. *Phytochemistry* **92**: 71-86.
214. Xiang Q., Wang Y., Wu W., Meng X., Qiao Y., Xu L. and Liu X. (2013). Carnosic acid protects against ROS/RNS-induced protein damage and upregulates HO-1 expression in RAW264.7 macrophages. *Journal Of Functional Foods* **5**: 362-369.
215. Xie J., Lin Y. S., Shi X. J., Zhu X. Y., Su W. K. and Wang P. (2013). Mechanochemical-assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves. *Industrial Crops and Products* **43**: 276-282.
216. Yang Y. and McClements D. J. (2013). Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified a-tocopherol acetate. *Food Chemistry* **141**: 473–481.
217. Yeddes N., Chérif J. K., Guyot S., Sotin H. and Ayadi M. T. (2013). Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. *Antioxidants* **2**: 37-51.
218. Yousef Ali Z. (2012). Biochemical evaluation of some natural products against toxicity induced by anti-tubercular drugs in rats. *New York Science Journal* **5(10)**: 69-80.
219. Yu J., Cleveland T. E., Nierman W. C and Bennett J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Rev Iberoam Micol* **22**: 194-202

220. Yumrutas O. and Saygideger S. D. (2012). Determination of antioxidant and antimutagenic activities of *Phlomis armeniaca* and *Mentha pulegium*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **02(01)**: 36-40.
221. Zhao Y., Dou J., Wu T. and Akber Aisa H. (2013). Investigating the Antioxidant and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceam*. *Molecules* **18**: 951-962.
222. Zhu Q., Qian Y., Zheng Z. P., Lo C., Chen F. and Wang M. (2012). Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation– induced modification on BSA. *Journal of functional foods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.006>.
223. Zizovic I., Stameni´ M., Orlovi´ A. and Skala D. (2005). Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae Family species: Mathematical modeling on the micro-scale and process optimization. *Chemical Engineering Science* **60**: 6747–6756.

Annex

Composition des milieux de culture

➤ **Milieu MH**

Extrait de viande de bœuf: 2.0g ;

Peptone de caséine: 17.5g ;

Amidon de maïs: 1.5g ;

Agar: 17.0g

pH: 7.4.

➤ **MH agar additionné de sang (gélose au sang)**

Infusion de viande de bœuf déshydraté: 300 g

Hydrolysate de caséine: 17.5 g

Amidon de maïs: 1.5 g

Sang de cheval lysé: 2 à 5%

Agar: 13 g

Eau distillée: 1000 ml

➤ **Milieu PDA**

Extrait de pomme de terre: 1000ml

Dextrose: 20g

Agar: 20g

➤ **Sabouraud simple**

Peptone: 10 g

Gélose: 20 g

Glucose: 20 g

Eau distillée: 1000 ml

➤ **Milieu Sabouraud + chloramphénicol**

Sabouraud simple + chloramphénicol 0.5g

الملخص

تَهْتَم العديد من البحوث العلمية حاليا بدراسة الفوائد الحيوية للجزيئات الطبيعية. تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للمكروبات لمستخلصين بالميثانول تم الحصول عليهما بواسطة النقع و جهاز Soxhlet على التوالي و للزيت الأساسي المستخلص بالتقطير المائي للأجزاء الهوائية لنبتة *Mentha rotundifolia*. قدر مردود الاستخلاص ب: 16.05 % (ك/ك)، 9.2 % (ك/ك) و 0.7 % (ح/ك) على التوالي. سمح الفحص الكيميائي- النباتي بإظهار فلافونويدات، دباغ، عديدات الفينول و تربنويدات في المستخلصين الميثانوليين. قدرت عديدات الفينول الكلية بواسطة متفاعل Ciocalteu-Folin حيث وجد 0.143 ± 141.57 (م م بواسطة النقع) ، 1.642 ± 168.642 (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ مستخلص . قدرت الفلافونويدات بطريقة AlCl_3 فكانت النتائج 15.636 ± 0.030 (م م بواسطة النقع)، 33.045 ± 0.76 (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ كارسيتين/ملغ مستخلص. كما قدر محتوى الفلافونولات و الفلافونات ب 42.6 ± 1.357 (م م بواسطة النقع) ، 47.071 ± 0.214 (م م ب Soxhlet) ميكروغرام مكافئ كارسيتين/ ملغ مستخلص. سمح تحليل الزيت الأساسي ب: GC/MS و GC بالتعرف على 43 مركب يتصدرها Oxyde de pépéritène (63%). قدر النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات باستعمال عدة اختبارات مختلفة، في حالة اختبار DPPH، كان التركيز المثبط ل 50% في حدود 2.221 ± 265.491 ميكروغرام/مل، 133.160 ± 11.346 ميكروغرام / مل 1755 ± 0.006 بالنسبة للمستخلصين الميثانوليين بواسطة النقع و Soxhlet و الزيت الأساسي على التوالي. أظهرت النتائج بالنسبة لاختبار استخلاص الأيونات أن المستخلصين الميثانوليين فقط لهما قدرة استخلاصية حيث قدرت قيم CE_{50} ب 3.417 ± 0.011 مل/مل، 2.194 ± 0.038 مل/مل . إضافة إلى ذلك تملك المستخلصات قدرة مرجعة بقيم CE_{50} : 550.325 ± 3.613 ميكروغرام/مل، 1 ± 468 ميكروغرام/مل، 1625 ± 0.004 ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلصين الميثانوليين بواسطة النقع و Soxhlet و الزيت الأساسي على التوالي. تم في هذه الدراسة أيضا تقييم النشاط المضاد للمكروبات، بينت النتائج أن المستخلصين الميثانوليين لا يملكان أي تأثير مضاد للمكروبات، بينما يملك الزيت الأساسي نشاط ضد ميكروبي متوسط ضد البكتيريا و عالي ضد الفطريات.

الكلمات المفتاحية: المستقلبات الثانوية، *Mentha rotundifolia*، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للمكروبات.

Summary

Actually, most investigation of current research focuses to study the biologically active compounds from natural molecules. The objective of this study is the evaluation of antioxydante and antimicrobial activities of two methanolic extracts obtained by maceration (MEM) and by Soxhlet apparatus (MES) and the essential oil (EO) obtained by hydrodistillation from the aerials parts of *Mentha rotundifolia*, the yields were 16.05 % (w/w), 9.2 % (w/w) and 0.7 % (v/w), respectively. The phytochemical screening led to identify polyphenols, flavonoids, tannins, terpenoids and quinons in the methanolic extracts. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent and found to be 141.571 ± 0.143 (MEM) and 168.642 ± 1.642 (MES) $\mu\text{g AGE/mg}$ of extract. Flavonoids, flavons and flavonols were evaluated by AlCl_3 method, the values of flavonoids are 15.636 ± 0.030 (MEM) and 33.045 ± 0.76 (MES) $\mu\text{g QE/mg}$ of extract. The levels of flavons and flavonols were estimated to be 45.426 ± 1.357 (EMM) 47.071 ± 3.214 (MES) $\mu\text{g QE/mg}$ of extract. Essential oils analyzed by GC and GC/MS allowed to identification of 43 constituents dominated by trans-piperitenone oxide (66.39%). The antioxidant activity of the extracts was evaluated in vitro by many tests. Concerning the DPPH test; The IC_{50} were: $265,491 \pm 2.221 \mu\text{g/ml}$, $133.160 \pm 11.346 \mu\text{g/ml}$ et $1755 \pm 0,006 \mu\text{g/ml}$ for EMM, EMS and EO respectively. For the test of ferrous ion chelating, only methanolic extracts have activity with EC_{50} of $3.417 \pm 0.011 \text{ mg/ml}$, $2.194 \pm 0.038 \text{ mg/ml}$ for EMM, EMS and EO respectively. The results also illustrate that the three extracts demonstrate reducing power with EC_{50} of $550.325 \pm 3.613 \mu\text{g /ml}$, $468 \pm 1 \mu\text{g /ml}$, $1625.5 \pm 0.004 \mu\text{g /ml}$ for MEM, MES and EO respectively. The effects of extracts seem to be weak when compared with standards effect. Antimicrobial effect of the methanolic extracts and the essential oil was evaluated by agar diffusion assay against seven microbial strains, four bacteria and three fungi. The result shown that methanolic extracts have no effect. Whereas, EO shown a strong antifungal and a moderate antibacterial activity.

Key word: Secondary metabolites, *Mentha rotundifolia*, antioxidant activity, antimicrobial activity.