



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Teneur en polyphénols et évaluation de l'activité
antioxydante de *Lavandula dentata* L

Présenté par : Jounaidi Wassim

Encadré par :

- Pr. Mikou Karima
- Dr. Chaimae RAIS

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

- Pr MIKOU KARIMA : FST Fès
- Pr RAIS CHAIMAE : ANPMA
- Pr FADIL FATIMA : FST Fès

Année universitaire
2020/2021

Dédicace

À mes parents pour leur soutien infatigable, leur patience
admirable
et leur affection continuelle, qui m'a beaucoup aidé dans ma
vie et
durant mes études.

À mes frères

À tous les membres de ma famille.

À tous mes amis.

À toute personne qui me connaît

Remerciements

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans l'agence nationale des plantes médicinales et aromatiques de Taounat. Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Directeur de l'agence de m'avoir donné cette opportunité.

*Je tiens à remercier également Docteur **Rais Chaimae** de m'avoir encadré tout au long de la réalisation de ce travail. Mes remerciements s'adressent au Professeur **Mikou Karima** pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Aussi pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.*

*Je remercie également Madame le Professeur **Fadil Fatima** d'avoir accepté de juger mon simple travail.*

Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire.

Je tiens à remercier de tout mon cœur ma famille pour son soutien sans faille et permanent qui a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Présentation de l'Agence nationale des plantes médicinales et aromatique

L'ANPMA (Agence Nationale des Plantes Aromatiques et Médicinales) est un des établissements universitaires, de recherche appliquée, d'appui technique et d'information, spécialisé dans les PMA. Dont les missions s'inscrivent dans le cadre de la charte et la loi 0100. (Décret de création du 4 juin 2002, Bulletin officiel du 27 juin 2002). Il s'inscrit dans le cadre :

- Des recommandations de la Charte Nationale de l'Education et de la Formation ;
- Des missions fixées à l'ANPMA (décret du 4 juin 2002) ;
- Des dispositions législatives et réglementaires ;
- Des mesures et objectifs envisagés pour la mise en place de la réforme ;

Résumé

Le présent travail est consacré à l'évaluation de la teneur en polyphénols de *Lavandula dentata* L. de la famille des Lamiaceae. Il vise également l'étude de l'activité antioxydante de cette espèce. Trois extraits sont préparés : l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux. L'extraction est réalisée par la méthode d' Ultrasons.

Le dosage de polyphénols, des flavonoïdes montre que l'extrait méthanolique (EM) par sonication est le plus riche en polyphénols (60,563 mg/g MS) et en flavonoïdes (50,42 mg/g MS) par rapport aux autres extraits.

Le pouvoir antioxydant des extraits est évalué *in vitro* par les tests du DPPH et la phosphomolybdate (la capacité antioxydante totale). Les résultats obtenus, révèlent que l'EM par sonication présente une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits étudiés.

Mots clés : *Lavandula dentata*L; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Activité antioxydante ; Sonication.

Liste d'abréviations

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EA : Extrait aqueux

EE : Extrait éthanolique

EM : Extrait méthanolique

FRAP : FerricReducing-Antioxidant Power

PAM : Plante aromatique et médicinal

CAT: Capacité antioxydante totale

ANPMA : Agence nationale des plantes médicinales et aromatiques

EAG : Equivalent d'acide gallique

EAA : Equivalent d'acide ascorbique

EQ : Equivalent de Quercitine

MS : Matière sèche

MF : Matière frais

Liste des tableaux

Tableau 1: poids (mg) de <i>lavandula dentata</i> L en fonction du temps(h).....	12
Tableau 2: Les valeurs d'IC50 des différents extraits et de BHT	15

Liste des figures

Figure 1: <i>Lavandula dentata</i> L	2	
Figure 2 : Test de DPPH	6	
Figure 3: Poudre végétale de <i>lavandula dentata</i> L Méthodes :	7	
Figure 4: Sonicateur	Figure 5: centrifugeur.....	8
Figure 6: Teneur en chlorophylle de <i>Lavandula dentata</i> L	12	
Figure 7: Teneur en polyphénols totaux de <i>Lavandula dentata</i> L.....	13	
Figure 8: teneur en polyphénols totaux de <i>lavandula dentata</i> L	14	
Figure 9: les % d'inhibition de DPPH	14	
Figure 10: Capacité antioxydante totale	16	

Sommaire

Dédicace.....	
Remerciements.....	
Présentation de l'Agence nationale des plantes médicinales et aromatique	
Liste d'abréviations.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
Introduction générale	1
Bibliographie	2
I Présentation de la plante <i>Lavandula dentata</i> L.....	2
1- Classification	2
2- Description botanique	2
3- Répartition géographique.....	2
4- Usage médicinal.....	3
5- Constituants chimiques.....	3
II Méthode d'extraction	3
III Généralités sur les composés phénoliques.....	4
1- Définition	4
a- Acides phénoliques	4
b- Flavonoïdes	5
c- Tanins.....	5
IV Activité antioxydante :	5
1- Généralités.....	5
2- Test de DPPH.....	6
3- Test de CAT	6
MATERIELS ET METHODES	7
I Matériel végétal.....	7
A- Méthode extraction par ultrasons.....	7
B- Analyse phytochimique.....	8
a- Teneur en eau	8
b- Teneur en chlorophylles	8
c- Dosage des polyphénols totaux.....	9

d-	Dosage des flavonoïdes	9
C-	Activités antioxydants de la plante <i>Lavandula dentata</i> L	10
a-	Test DPPH.....	10
b-	Capacité antioxydante totale	10
D-	Analyses statistiques :	11
	Résultats et discussion	12
I.	Teneur en eau :	12
III.	Composés phénoliques	13
1-	Teneur des polyphénols totaux :	13
2-	Teneur des flavonoïdes	13
IV.	Activités antioxydantes	14
1-	Activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	14
2-	Evaluation de l'activité antioxydante par le phosphomolybdate	15
❖	Conclusion.....	17
	Références	18
	Annexe	20

Introduction générale

Le Maroc a une richesse végétale très variée avec environ 4200 espèces, dont 600 plantations avec des propriétés médicinales et aromatique, qui place le royaume à la deuxième gamme mondiale après la Turquie. Il produit chaque année environ 140.000 de ces plantes qui font l'objet d'une attention croissante en raison de leur utilisation dans divers domaines, dont médecine traditionnelle, les produits cosmétiques, la conservation des aliments, l'extraction d'huiles essentielles. (Jaa Y, 2021). Les plantes médicinales constituent un réservoir important de substances naturelles pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques.

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison de risques toxicologiques potentiels. Désormais de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé.

Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies, ils sont également utilisés comme additifs en industrie agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier la teneur en polyphénols de la plante *Lavandula dentata* L, ainsi d'évaluer son activité antioxydante via deux méthodes "DPPH, CAT".

La conception et réalisation de ce projet d'étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources végétales par des recherches scientifiques. Parmi ses ressources végétales, l'espèce *Lavandula dentata* L très connue par son utilisation thérapeutique.

Pour se faire plusieurs étapes ont été réalisées :

- La première étape traitant de l'état de connaissance de la littérature sur *Lavandula dentata* L ;
- Deuxième étape présente le matériel végétal et l'ensemble des méthodes utilisées dans la partie pratique de cette étude ;
- Troisième étape est consacrée aux résultats obtenus, leur discussion et interprétations ;
- Finalement une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus suivie par des perspectives importantes qui font suite à ce travail ;

Bibliographie

I Présentation de la plante *Lavandula dentata* L

1- Classification

D'après *Mark, W., (2009)*, *Lavandula dentata* L. est classée comme suit :

Règne	: Plantae
Sous règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiacées
Sous-famille	: Nepetoideae
Genre	: <i>Lavandula</i>
Espèce	: <i>Lavandula dentata</i> L.



Figure 1: *Lavandula dentata* L

2- Description botanique

- ❖ **Nom populaire** : Lavande dentée, lavande des Alpes, lavande anglaise ...
- ❖ **Nom latin** : *Lavandula dentata* L.
- ❖ **Nom arabe** : Khzama (الخزامى).

Lavandula dentata est un pseudo-arbuste qui forme un amas de tiges quadrilatères, ligneuses, écaillées à la base, et plaquées sous le sommet de la fleur. Les feuilles persistantes sont très étroites, avec des bords bouclés, dentés et crénelés.

Une autre caractéristique de la lavande est le grand nombre de fleurs bleu-violet clair observées au printemps. Les fleurs et les bractées sont bleues. La corolle à pétale unique est inversée, le tube est plus long que le calice et le limbe est divisé en cinq lobes ronds de longueur inégale, incomplètement divisés en deux lèvres. Le fruit est un tétractène (*Ecribano B., Santos ,2003*).

3- Répartition géographique

Ce chamaephyte pousse dans les sols rocheux et arbustifs des régions arides de la Méditerranée ou du Sahara. Il existe également dans le haut Atlas, les côtes de l'Anti-Atlas et de Rif et les niveaux de végétation de basse montagne (*Beloued, 1999*).

4- Usage médicinal

La *Lavandula dentata* L est une espèce végétale bien connue. Elle est utilisée comme insectifuge contre les infections et pour drainer la bile et le mucus.

Au Maroc *Lavandula dentata* est largement utilisée en médecine traditionnelle pour guérir les coliques, les flatulences, les douleurs de la rate, les maux de tête, l'insomnie, la nervosité, le refroidissement, la fatigue, la bronchite, la grippe, les menstruations douloureuses, la tension, la fièvre et les infections. Elle possède également des vertus analgésiques, sédatives, antiseptiques et antimicrobiennes. Les parties aériennes, surtout les inflorescences, sont utilisées comme un agent antiseptique et stimulant dans la cuisine, elles sont également utilisées comme herbe culinaire pour préparer un type particulier de couscous (**Hodek et al 2002**).

5- Constituants chimiques

Au Maroc, la production annuelle des huiles essentielles (HE) de la Lavande a été estimée à 462 tonnes. C'est pour cette raison que la détermination de la composition chimique de *Lavandula dentata* est plus spécifiée aux HEs présentes chez cette plante.

La composition de l'huile essentielle de *Lavandula dentata* varie plus au mois selon l'environnement d'une région à l'autre (Annexe 1). Les HE isolées sont des mélanges complexes d'hydrocarbures monoterpéniques, alcools, aldéhydes, cétones, époxydes, phénols et esters et sont caractérisées par la prédominance des hydrocarbures monoterpéniques (Bettaieb, 2017). Ainsi le 1,8-cinéole (41,3%) et le sabinène (13,9%), le sabinol (6,8%) et le myrténique (5,1%) ont été les principaux constituants de l'huile *Lavandula dentata* L du Maroc (**Imelouane, 2009**).

II Méthode d'extraction

a- Décoction :

Pour extraire les principes actifs des racines, de l'écorce, des tiges et des baies, il faut généralement leur faire subir un traitement plus énergique qu'aux feuilles ou aux fleurs, une décoction consiste à faire bouillir dans de l'eau les plantes séchées ou fraîches, préalablement coupées en petits morceaux, on peut la consommer chaude ou froide

b- Infusion :

L'infusion est la façon la plus simple d'accommoder les feuilles et les fleurs pour obtenir des remèdes ou des boissons fortifiantes ou calmantes, on la prépare exactement comme le thé, à

partir d'une seule plante ou d'un mélange de plusieurs, et on la boit chaude ou froide, elle consiste à verser de l'eau chaude ou bouillante sur les plantes sèches, le temps d'infusion est variable selon les plantes

c- **Macération :**

Cette technique désigne la préparation la solution en plaçant la matière végétale avec la totalité du liquide d'extraction dans un récipient fermé, et en le laissant reposer pendant 7 jours, en le secouant de temps à autre. Le contenu est alors filtré avant de presser le marc, l'extrait liquides ainsi obtenu sont mélangés, la préparation est clarifiée par précipitation ou filtration, dans la méthode traditionnelle, la précipitation suivie de décantation est plus courante, Grâce à ces techniques, les principes actifs hydrosolubles sont extraits, une filtration sera nécessaire avant la consommation).

III Généralités sur les composés phénoliques

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions de vie de la plante qui doit s'engager dans la concurrence pour les éléments nutritifs et faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier autre que le métabolisme primaire (glucides, protéines et lipides) lui permettant de synthétiser diverses substances pour s'adapter et se défendre : les métabolites secondaires.

Actuellement plus de 100000 métabolites secondaire ont été identifiés, ils appartiennent à trois classes principales qui sont les terpènes (un groupe des lipides), les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés), et les composés phénoliques (dérivés de glucides) (**Benamor, 2008**).

1- Définition

Les polyphénols ou composés phénoliques forment une grande classe de produits chimiques qu'on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés photochimiques polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils subdivisent en sous classe principales; les **acides phénols, les flavonoïdes, les tanins...** (**Sarni-machado et Cheynier,2006**).

a- Acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et

liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique).

b- Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carboné (**Heller et Forkmann, 1993**).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines. (**Harborne, Williams, 2000**)

Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes

Les flavonoïdes sont généralement des antibactériennes (**Wichtl et Anton, 2009**). Ils peuvent être exploités de plusieurs manières dans l'industrie cosmétique et alimentaire (jus de citron) et de l'industrie pharmaceutique (les fleurs de trèfle rougetraient les rhumes et la grippe en réduisant les sécrétions nasales), comme certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (**Iserin et al, 2001**).

c- Tanins

Le Tanin est un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux. On distingue deux catégories : Les tanins condensés, polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines.

Les tanins hydrolysables, polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique (**Hopkins, 2003**).

IV Activité antioxydante :

1- Généralités

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme ; ce

sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**) mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides, des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose.

2- Test de DPPH

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. (Figure2).

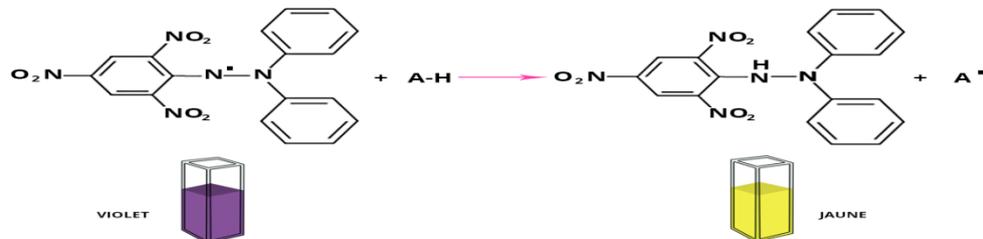


Figure 2 : Test de DPPH

La réduction du DPPH est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm (λ_{max} DPPH). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant. (**Mansouri A et al 2005**)

3- Test de CAT

L'**indice CAT** indique l'**activité antioxydante** globale d'un aliment ou d'une plante, c'est-à-dire sa capacité à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme humain. Plus l'aliment a une valeur TAC élevée, plus il est antioxydant. Son unité de mesure est la micromole (μmol).

La méthode utilisant le phosphomolybdate d'ammonium est un test antioxydant important basé sur la réduction de Mo+6 en Mo+5 par un composé antioxydant. Ceci conduit à la formation d'un complexe de phosphate Mo+5, de couleur verte, avec une absorption maximale à 695nm. (**Nagavani et al, 2010**).

MATERIELS ET METHODES

I Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour la présente étude est constitué par la partie aérienne de *lavandula dentata* L. provenant du jardin botanique de l'agence nationale des plantes médicinales et aromatiques. La plante est récoltée le 28 Avril 2021.

Les plantes récoltées sont séchées à l'étuve à 36°C pendant trois jours. Elles sont par la suite broyées pour obtenir une poudre fine (figure 3) qui sert à la préparation des extraits.



Figure 3: Poudre végétale de *Lavandula dentata* L

II- Méthodes expérimentales

A- Méthode extraction par ultrasons

✓ Principe:

En milieu liquide, les ondes émises par l'appareil conduisent au phénomène de cavitation (Bulles). Ces bulles microscopiques vont croître jusqu'à devenir instables et imploser, entraînant des températures et des pressions élevées. Au cours de l'implosion, un micro jet dirigé vers le matériel végétal est créé, causant la destruction des parois cellulaires de la matrice végétale et leur contenu peuvent être libéré dans le milieu environnant. (Pétrier., 2008).

✓ Protocole :

40 mg de poudre végétale sont mélangés avec 10 ml de chaque solvant (Aqueux, méthanol, éthanol) au bain d'eau à l'aide d'un sonicateur pendant 45 min (Figure 4).

Le mélange est par la suite centrifugé pendant 10 min à 5000 g ; le surnageant récupéré servira aux différents dosages (phénols totaux et des flavonoïdes) ainsi qu'à la mise en évidence et la quantification de l'activité antioxydante.



Figure 4: Sonicateur



Figure 5: centrifugeuse

B- Analyse phytochimique

a- Teneur en eau

La teneur en eau permet la détermination de la quantité d'eau existante dans la plante.

La teneur relative en eau est calculée selon la formule suivante :

$$W = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

Pf: poids de la matière fraîche de la plante

Ps : poids de la matière sèche de la plante

La teneur en eau est exprimée en pourcentage (%).

✓ Procédure :

Des échantillons de la plante sont pesés puis mis dans une étuve à une température de 50°C pendant 20 heures. Après le poids des échantillons est noté. Le suivi est réalisé par des pesées jusqu'à la stabilisation du poids des échantillons. Pour cette détermination trois répétitions sont réalisées (annexe 2)

b- Teneur en chlorophylles

L'extraction de la chlorophylle est faite suivant la méthode de **Mac Kiney** (1941) et **Arnon** (1949). 40 mg de feuilles fraîches de *lavandula dentata L* ont été ajoutés à 4ml de DMSO. L'ensemble a été incubée a 65°C pendant 1h, la densité optique est mesurée aux longueurs d'ondes 663nm et 645nm correspondant respectivement aux chlorophylles (a) et (b). Les résultats sont exprimés en mg/g de MF et les concentrations en chlorophylle (a) et (b) sont déterminées à l'aide des équations suivantes:

- **Chl. (a) mg/g MF = [0.0127*DO(663)-0.00269*DO(645)]**
- **Chl. (b) mg/g MF =0.229*DO(645)-0.00469*DO(663)]**
- **Chl. totale mg/g = (0,0202 *D.O645)+(0.00802*DO(663)]**

c- Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin –Ciocalteu (wong et *al*, 2006). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides: acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$), réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

✓ Protocole :

100µl d'extrait végétal sont mélangés avec 500µl de réactif de Folin (10%), après 1h d'obscurité, 2ml de NO₂CO₃ (2%) ont été ajoutés, placé à l'obscurité pendant 1h. L'absorbance a été déterminée à 760 nm. La teneur en polyphénols est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par mg de matière sèche par référence à une gamme d'étalonnage, réalisée par une série de dilution de l'acide gallique (1mg/ml) (Annexe 4).

d- Dosage des flavonoïdes

✓ Principe :

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl₃ avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, AlCl₃ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes (Chang *et al.* 2002).

✓ Protocole :

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) cité par Chang *et al* (2002) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans notre extrait. Le protocole de dosage est le suivant: 1ml de

l'extrait végétal a été mélangé avec 0.3ml de NaNO₂ (5%), après 5 min de l'obscurité, 0.3 ml de AlCl₃ (10%) ont été ajoutés au mélange et placée à l'obscurité pendant 6 min , un volume de 2 ml de NaOH (1M) a été ajouté . le volume total a été complété a 10ml avec l'eau distillée . L'absorbance a été déterminée à 510nm. La teneur est exprimée en microgramme d'équivalent de la quercitrine par mg de matière sèche par référence à une gamme d'étalonnage réalisée par des concentrations de la quercitrine (1mg/ml) (Annexe 6).

C- Activités antioxydants de la plante Lavandula dentata L

a- Test DPPH

✓ Principe :

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (**Molyneux, 2004**). Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (**Popovici et al, 2010 ; Molyneux, 2004**).

✓ Protocole:

Une série de dilution a été préparée à partir de la solution mère de chaque extrait, puis 1ml de DPPH () a été ajouté.

Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC₅₀). Cette IC 50 est comparée à celle d'un témoin positif composé de BHT et préparé de la même façon que les essais.

b- Capacité antioxydante totale

✓ Principe :

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo MoO_2 en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant.

✓ **Protocole :**

100 μl de chaque extrait sont mélangés avec 3 ml de phospho-molybdate préparé à partir de H_2SO_4 (6M), Na_2PO_4 (280mM) et molybdate d'ammonium (40 mM). Le mélange est ensuite incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 100 μl de méthanol mélangé avec 3000 μl du phospho-molybdate. Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS) (Annexe 10).

D- Analyses statistiques :

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2007, les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm l'écart type. Chaque expérience a été faite avec 3 répétitions. Les significations statistiques entre les solvants utilisées ont été évaluées avec l'ANOVA en utilisant le logiciel IBM SPSS statistics afin de déterminer des différences significatives à $P < 0,05$.

Si $0.01 < p \leq 0.05$ il y a une différence significative au seuil de 5%

Si $0.001 < p \leq 0.01$ il y a une différence hautement significative au seuil de 1%

Si $p \leq 0.001$ il y a une différence très hautement significative au seuil de 1%

Résultats et discussion

I. Teneur en eau :

Le taux d'humidité correspond à 64.83% pour les trois répétitions de *L. dentata*, et donc plus de la moitié du poids frais de espèces est constituée d'eau (tableau 1).

Tableau 1: Poids de *Lavandula dentata* en fonction du temps de séchage

Espèce	<i>Lavandula dentata</i> L
Teneur en eau (%)	64,83

II. Teneur en chlorophylle

d'après les résultats on considère que notre plante *lavandula dentata* L a un teneur plus élevé de chlorophylle a qui est le plus abondante chez les organismes qui mettent en œuvre la photosynthèse (Figure 6), par contre au chlorophylle b qui est une forme de chlorophylle de couleur vert olive qui absorbe essentiellement la lumière bleue et qui est d'avantage soluble en milieu aqueux que la chlorophylle "a " en raison de la présence d'un groupement carbonyle dans sa structure (annexe 3).

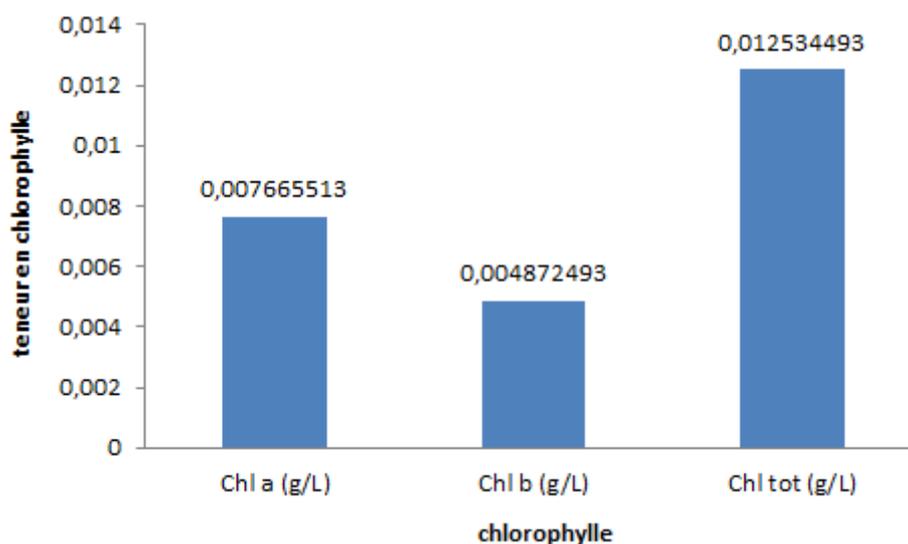


Figure 6: teneur en chlorophylle de *Lavandula dentata* L

III. Composés phénoliques

1- Teneur des polyphénols totaux :

Les résultats de la figure 7 montrent que *Lavandula dentata* contient une teneur en polyphénols allant jusqu'à 51.938mg EAG/g de MS pour l'extrait aqueux, 60.563 EAG/g de MS pour l'extrait méthanolique, 35.688 EAG/g de MS pour l'extrait éthanolique (figure 7) ; donc Il paraît clairement que le méthanol est le solvant qui permet d'avoir un rendement en polyphénols totaux plus élevé.

Ces résultats concordent avec ceux d'autres travaux qui ont affirmé que le méthanol est le solvant approprié pour une forte récupération des polyphénols (Falleh et al., 2008).

L'analyse de la variance relative à la teneur de polyphénols montre une différence hautement significative au seuil ($p=0.005$). (Annexe 5)

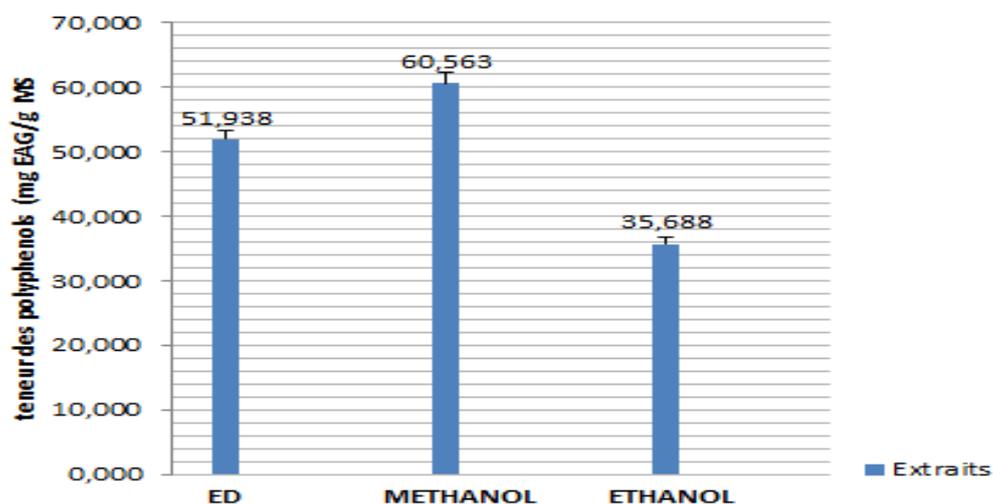


Figure 7: teneur en polyphénols totaux de *lavandula dentata* L

2- Teneur des flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes (Figure 8) sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité. Pour l'extrait méthanolique la teneur en flavonoïdes est 50,42mgEQ/g de MS suivi de celles de l'extraits éthanolique et aqueux avec 40.28 et 35mgEQ/g MS respectivement. Donc Il paraît clairement que le méthanol est le solvant qui permet d'avoir un rendement en flavonoïdes plus élevé.

. Ces résultats concordent avec ceux d'autres travaux qui ont affirmé que le méthanol est le solvant approprié pour une forte récupération des flavonoïdes (Upson et al., 2000).

L'analyse de la variance relative à la teneur des flavonoïdes montre une différence hautement significative entre les différents extraits étudiés ($p=0.001$) (Annexe 7).

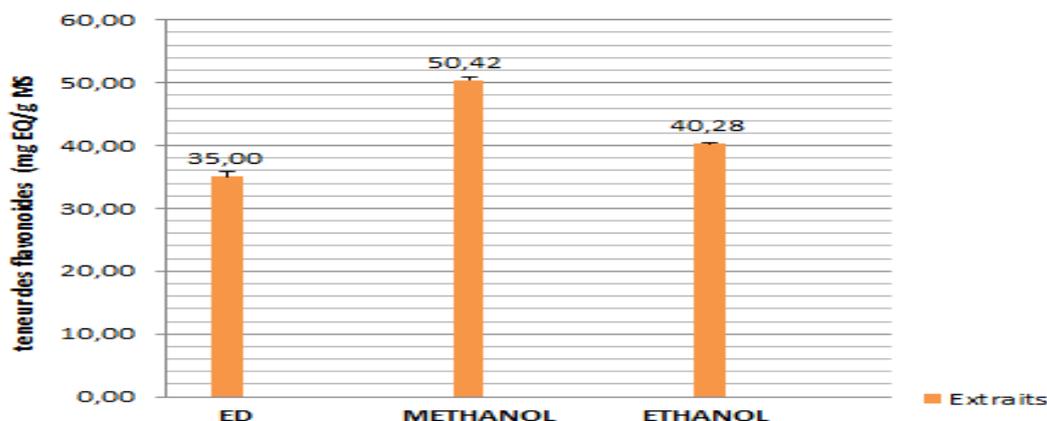


Figure 8: teneur en flavonoïdes totaux de *lavandula dentata* L

IV. Activités antioxydantes

1- Activité antioxydante par diphenyle-picryl-hydrazyl (DPPH)

Les résultats de l'activité antioxydante évaluée par le test de DPPH sont illustrés par la figure (figure 9), ils nous montrent que le pourcentage d'inhibition du DPPH dépend de la concentration de nos extraits étudiés et de BHT. L'extrait méthanoïque présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé (95,74%), les valeurs des extraits éthanolique et aqueux sont respectivement 90,09% et 82,10%.

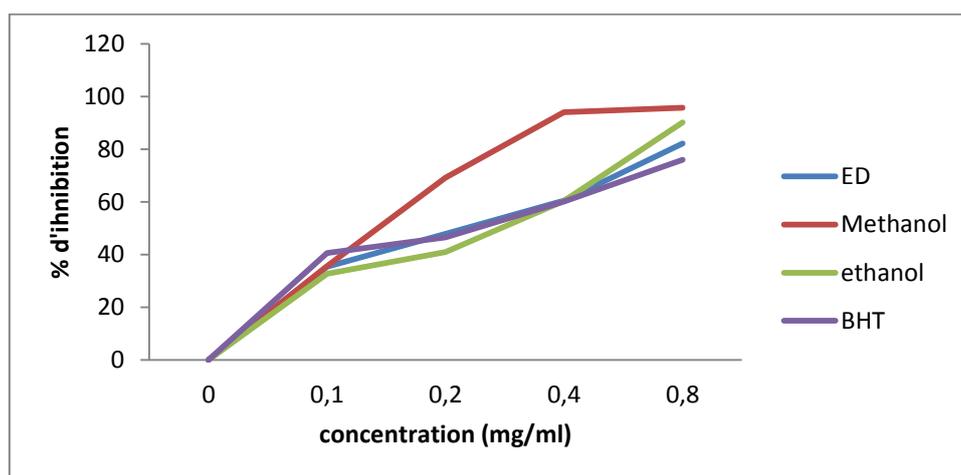


Figure 9: % d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration

En général, tous les extraits de *Lavandula dentata* L ont provoqué une décoloration plus au moins différente de la solution DPPH, ceci prouve leur capacité antioxydante qui est exprimée par les valeurs IC50 (Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant

requis pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante.

Les valeurs d'IC50 sont déterminées graphiquement à partir de la courbe réalisée en fonction des concentrations des extraits et leurs pourcentages d'inhibition respectifs. (Tableau 2). On constate que l'extrait méthanolique enregistre la valeur la plus faible d'IC50 (0,0531%), cela signifie que son activité antioxydante est plus importante que les deux autres extraits et aussi le BHT.

- Ces résultats concordent avec ceux d'autres travaux qui ont affirmé que le méthanol et l'éthanol sont des solvants appropriés pour des activités antioxydantes très importantes. (Navarrete *et al.*, 2011)

L'analyse de la variance relative à l'activité antioxydants montre une différence hautement significative ($p < 0.001$). (Annexe 8)

Tableau 2: Les valeurs d'IC50 des différents extraits et de BHT

EXTRAIT	IC50 (mg/ml)
Aqueux	0,273
méthanol	0,0531
éthanol	0,301
BHT	0,460

2- Evaluation de l'activité antioxydante par le phosphomolybdate

Les résultats de la capacité antioxydant mesurée par le test de phosphomolybdate sont représentés dans le graphe. (Figure 10)

L'examen des résultats de cette activité témoigne de la variabilité très élevée chez la lavande dentée ainsi que sa dépendance de la richesse en composés phénoliques. En effet, l'activité antioxydant totale des différents extraits varient entre 54.81 et 67.158 mg EAG/gMS. L'extrait aqueux est au premier rang avec une activité antioxydant totale statistiquement la plus importante (67.158 mg EAG.g-1MS) par rapport aux autres extraits. L'extrait méthanoïque vient en deuxième position (66.424 mg EAG.g-1MS) suivies par l'extrait éthanolique (54.81 mg EAG.g-1MS), autrement dit ; selon la figure, les deux extraits aqueux

et méthanolique présentent presque les mêmes activités antioxydants, et donc on peut dire que les deux extraits réagissaient avec le réactif de phosphomolybdate de la même façon.

L'analyse de la variance relative à l'activité antioxydants montre une différence hautement significatif ($p < 0.001$). (Annexe 11)

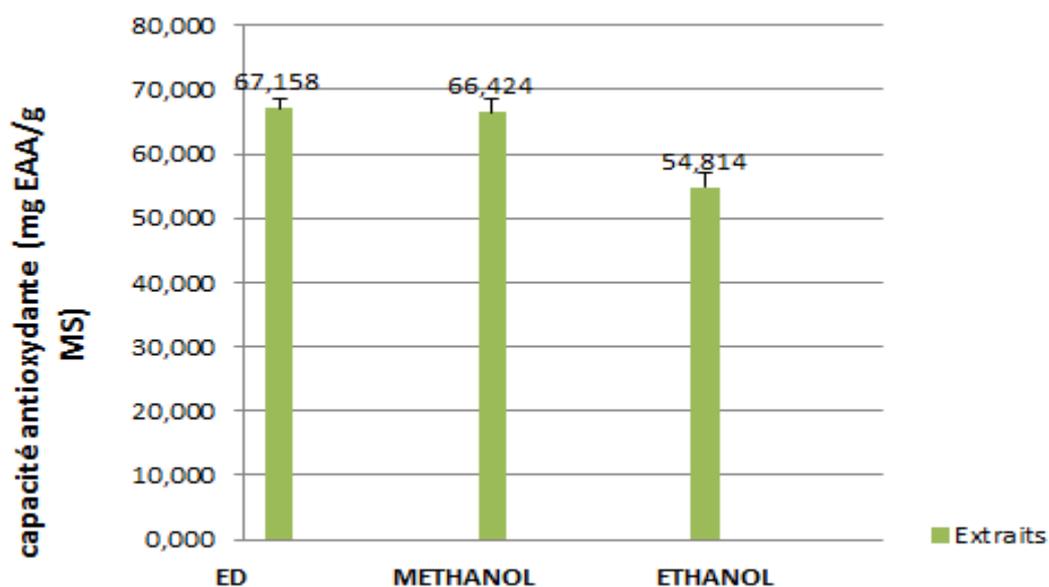


Figure 10: Capacité antioxydants totale

Le potentiel antioxydant des différents extraits de *lavandula dentata* L, évalué par le test de DPPH et la capacité antioxydante totale ont montré une corrélation positive avec les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes.

❖ Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part, du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. L'étude des propriétés antioxydantes des extraits de *Lavandula dentata* L nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Les différents résultats présentés dans ce travail indiquent que *Lavandula dentata* L montre une activité antioxydante, variable selon le solvant d'extraction utilisé. C'est l'extrait méthanolique qui a montré une activité antioxydante la plus importante c'est également cet extrait qui s'est montré le plus riche en composés phénoliques. L'activité antioxydante de la plante peut donc être liée à sa teneur en composés phénoliques.

En fin, l'ensemble des résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir valoriser davantage l'espèce *Lavandula dentata* L.

Références

- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Laglaoui, A.** Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha : Mentha spicata, Mentha pulegium et Mentha piperita, Phytothérapie ; Lavoisier DOI 10.1007/s10298-015-0970-y, 2015.
- Bartosz G.** ; 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- Beloued, A. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles: flore d'Algérie et du Maghreb; substances végétales des régions d'Afrique, d'orient et d'occident. *Libraires Modernes: Rouïba, Algérie.*
- Bertrand B. (2010).** Les Secrets De L'ortie.- 7ème Edition. Editions De Terran (Collection Le Compagnon Végétal; N : 01) : 128
- BettaiebRebey, I., Bourgou, S., SaidaniTounsi, M., Fauconnier, M. L., & Ksouri, R. (2017).** Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavanduladentata*). *Journal of New Sciences Agri & Biotech*, 39(2), 2096-2105.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Paris : Edition médicales internationales. Edition Tec & Doc Lavoisier 1120p.
- C. M. Cook and T. Lanaras, "Essential Oils: Isolation, Production and Uses," in *Encyclopedia of Food and Health*, 1st ed., **B. Caballero, P. Finglas, and F. Toldra, Eds. Elsevier, 2016**, pp. 552–557.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Ecribano B., Santos B. 2003.** Polyphenols extraction from foods. In *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C.** *Comptes Rendus Biologies*, 331 :372-379, 2008
- Favier A. ; 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 11, 108-115.
- Harborne J. B., Williams C. A., 2000.** Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481–504.
- Heller W., Forkmann G., 1993.** Biosynthesis of flavonoids. Chapman and Hall, London: 499-535.
- Hopkins W. G., 2003.** Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris: 514.
- Imelouane, B., Elbachiri, A., Ankit, M., Benzeid, H., & Khedid, K. (2009).** Physico chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of eastern Moroccan *Lavanduladentata*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2), 113-118
- Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., DE LAAGE DE MEUX A., Moulard F., ZHA E., DE LA ROQUE R., DE LA ROQUE O., VICAN P., DEELESALLE -FEAT T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J., Botrel A., 2001.** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2ème édition de VUEF, Hong Kong.
- Jaa, Y (2021),** Plantes aromatiques et médicinales: le Maroc est placé 2e au niveau mondial. *Économie*
- Mac Kinney G., 1941.** Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P.,** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemist.* 89(2005)411-420.
- Mark, W., (2009).** *Applii The Linnean Botanical Journal Of The Linnea Society* ». Edition The Linnean Society Of London. P116.

- Molyneux, P. (2004).**The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J. Sci. Technol.*, 26, 211–219.
- Nagavani V, Madhavi YD, Bhaskarrao P, Koteswara R, Raghava-Rao T. (2010).** Free radical scavenging activity and qualitative analysis of polyphenols by RP-HPLC in the flowers of *Couroupita quianensis* abul. *EJEAF. Chem*, 9(9): 1471-1484.
- Navarrete, A., et al. (2011).** Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*. 104(2): 196-201.
- Nogaret-Ehrhart As., (2003).** *La Phytothérapie Se Soigner Par Les Plantes.*, Edition Eyrolles, P19-36
- OU B., HAMPSCH-WOODILL M., PRIOR R L., 2001.** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49): 4619-4626.
- Pétrier, C., Gondrexon N. et Boldo P. (2008).** Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur AF*. 6310. pp : 1-14.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1–8.
- Potel A -Ma .,(2002)-** Les Plantes Médicinales Au Sénégal (Commune De Nguékokh, Zone De La Petite Côte) Extraits Du Rapport Du Stage, Sciences Naturelles, Effectué A Nguékokh, 22p
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337–341.
- Sarni-Manchado P., Veronique C., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaires. *Collection sciences et techniques agroalimentaires*, édition TEC et DOC, Paris (France):398.
- Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, et al (2000)** Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem Syst Ecol* 28:991–100722.
- Wichtl M., Anton R., 2009.** *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* Édition LAVOISIR, Paris: 38, 41.

Annexe

Composés	Identification	%		
		Feuille	Tige	Racine
α -Pinène	TR, GC/MS	0.39±0.02	1.01±	-
β -Phellandrène	TR, GC/MS	0.35±0.03	-	-
β -Pinène	TR, GC/MS	2.99±0.01	1.88±0.05	-
Limonène	TR, GC/MS	-	14.91±0.03	1.49±0.03
1,8-Cinéole	TR, GC/MS	22.90±1.25	7.44±0.05	3.22±0.03
<i>p</i> -Menth-8-en-1-ol	TR, GC/MS	0.29±0.01	-	-
Oxyde de linalool	TR, GC/MS	0.60±0.01	-	-
γ -Terpinène	TR, GC/MS	-	1.98±0.01	-
α -Thujone	TR, GC/MS	2.06±0.05	-	-
Linalool	GC/MS	5.25±0.03	1.17±0.05	-
Fenchone	GC/MS	0.42±0.01	0.72±0.05	-
α -Campholénal	TR, GC/MS	0.48±0.05	-	-
Heptane-2-one	TR, GC/MS	1.22±0.01	0.67±0.01	-
<i>Trans</i> -pinocarveol	TR, GC/MS	4.51±0.01	2.13±0.01	1.31±0.01
Camphre	TR, GC/MS	26.52±0.06	9.59±1.69	4.44±0.05
Pinocarvone	GC/MS	3.29±0.01	1.35±0.02	1.01±
Bornéol	TR, GC/MS	2.97±0.01	1.38±0.01	-
Terpinène-4-ol	TR, GC/MS	0.30±0.02	-	-
Cryptone	GC/MS	0.84±0.01	-	-
3-Cyclohexane-1-methanol	GC/MS	1.04±0.01	-	-
Myrténol	TR, GC/MS	5.65±0.22	2.09±	1.92±0.05
Acétate de Bornyle	GC/MS	-	1.69±0.01	-
Hept-3-en-2-one	TR, GC/MS	0.57±0.01	-	-
<i>Trans</i> -Carvéol	GC/MS	0.30±0.01	-	-
Carvone	TR, GC/MS	1.14±0.01	-	-
Germaacrène-D	TR, GC/MS	0.28±0.01	-	-
β -Selinène	GC/MS	0.36±0.01	-	1.55±0.02
1,1-Diméthyléthyl-phénol	TR, GC/MS	0.18±0.01	2.89±0.85	2.26±0.05
<i>Cis</i> -Calamenène	GC/MS	0.14±0.00	-	1.06±0.01
α -Bisabolène	GC/MS	0.57±0.00	-	1.33±0.01
Oxyde de caryophyllène	TR, GC/MS	0.24±0.01	0.52±0.03	0.92±0.05
α -Copaène	GC/MS	0.18±0.00	-	0.88±0.01
β -Bisabolène	GC/MS	0.24±0.02	-	-
β -Eudésémol	GC/MS	1.65±0.01	3.12±0.02	-
4-Méthylthioquinone	GC/MS	-	0.43±0.02	-
Pyrimidine	GC/MS	0.46±0.01	-	1.43±0.05
α -Bisabolol	GC/MS	0.55±0.03	1.20±0.03	3.43±0.01
<i>Cis</i> -Lancéol	GC/MS	0.25±0.01	-	-
β -Citral	GC/MS	-	0.46±0.04	-
Nérol	TR, GC/MS	-	-	1.45±0.02
β -Ocimène	TR, GC/MS	-	-	39.17±0.08
α -époxyde de bisabolène	TR, GC/MS	-	-	1.92±0.03
β -Pinène	TR, GC/MS	-	14.02±0.01	1.62±0.05
Vulgarol	GC/MS	0.12±0.01	-	-
Camphène	GC/MS	9.55±0.33	0.51±0.01	-
Acide hexadécanoïque	GC/MS	-	-	1.85±0.02
Acide octadécanoïque	GC/MS	0.14±0.04	-	1.61±0.06

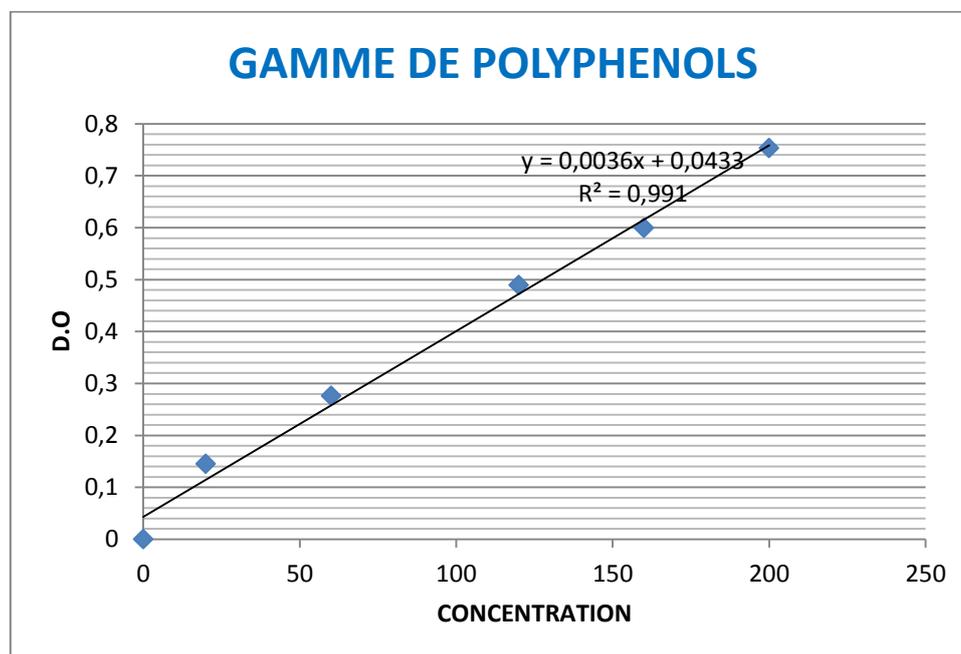
Annexe 1 : les compositions chimique des huiles essentielles de *lavanduladentata* L.

Annexe 2 : teneur en eau

On peut expliquer ces différences dans la teneur d'eau par plusieurs facteurs qui pourraient influencer la teneur en eau et en matière sèche des plantes comme la nature des fibres, l'âge des plantes, l'état du sol et la durée de conservation du végétal après récolte.

Annexe 3: teneur chlorophyllien

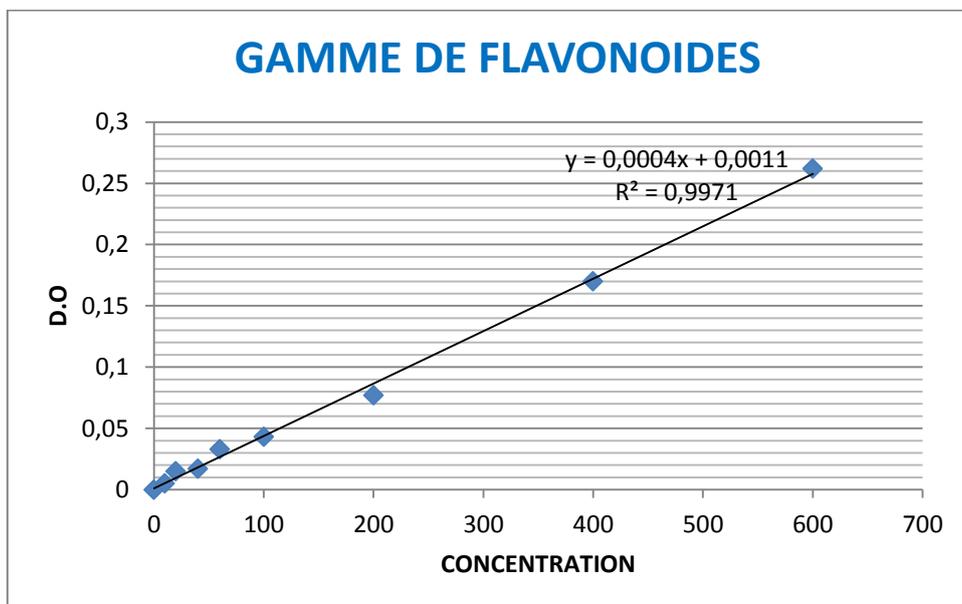
Echantillon	PF (mg)	Abs (663nm)	Abs (645nm)	Chl a (g/L)	Chl b (g/L)	Chltot (g/L)
1	40,3	0,703	0,328	0,00804578	0,00422116	0,01226366
2	40,1	0,653	0,373	0,00728973	0,00548566	0,01277166
3	40,2	0,678	0,353	0,00766103	0,00491066	0,01256816
Moy				0,007665513	0,004872493	0,012534493
standard erreur				0,000178212	0,000298453	0,000120523



Annexe 4 : Gamme d'étalonnage des polyphénols totaux

Annexe 5: analyse de la variance relative à la teneur en polyphénols des différents extraits de *Lavandula dentata* L

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
EXTRAIT	638,146	2	319,073	49,321	0,005
Error	19,408	3	6,469		



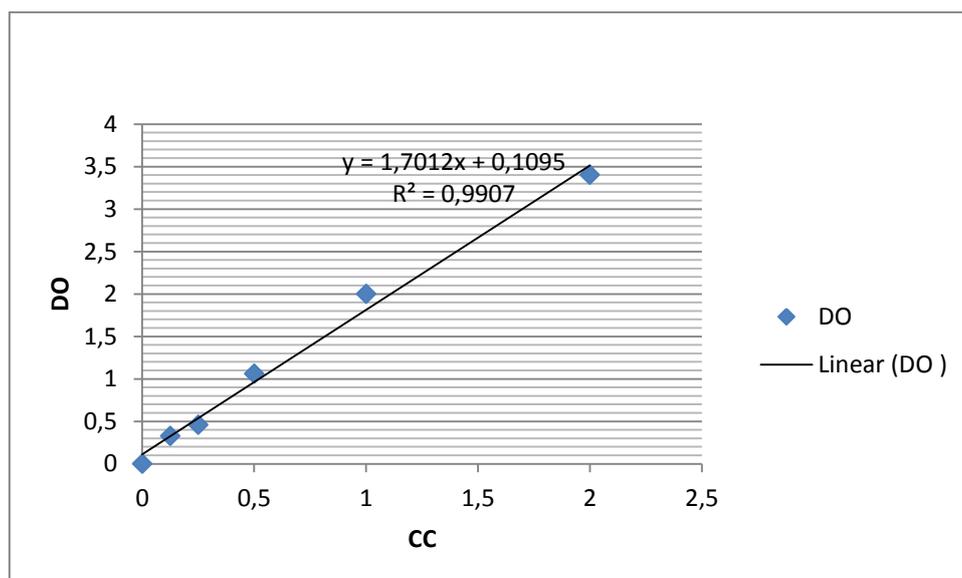
Annexe 6: gamme d'étalonnage des flavonoïdes

Annexe 7: analyse de la variance relative à la teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Lavandula dentata* L

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
EXTRAIT	235,316	2	117,658	122,914	0,001
Error	2,872	3	0,957		

Annexe 8: analyse de la variance relative à la concentration inhibitrice des différents extraits de *Lavandula dentata*L

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
EXTRAIT	0,108	2	0,054	35,248	0
Error	0,009	6	0,002		



Annexe 10: gamme de la capacité antioxydants totale

Annexe 11: analyse de la variance relative à la capacité antioxydante totale de *Lavandula dentata* L

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
EXTRAIT	265,95	2	132,975	11,572	0,009
Error	68,948	6	11,491		