

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de recherche : Biotechnologies, environnement et santé

THESE DE DOCTORAT

EN BIOLOGIE

**SCREENING CHIMIQUE ET ETUDE BIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
D'UNE PLANTE MEDICINALE, *Melissa officinalis* L.**

Par

FEKNOUS Souad

Devant le jury composé de :

G. TAIL	Professeur, USD Blida-1	Présidente
S. BELHADJ	Professeur, UZA Djelfa	Examinatrice
K. HOUALI	Professeur, UMM Tizi-Ouzou	Examineur
N. SMAIL SAADOUN	Professeur, UMM Tizi-Ouzou	Examinatrice
F. HAMAI-DI-CHERGUI	MCA, USD Blida-1	Examinatrice
F. SAIDI	Professeur, USD Blida-1	Directrice de thèse

Blida, 2018

RESUME

Cette étude s'intéresse à la valorisation d'une plante utilisée en médecine populaire algérienne qui appartient à la famille des Lamiacées : *Melissa officinalis* L. Le travail porte sur des enquêtes ethnobotaniques effectuées sur terrain et sur la détermination de quelques caractères biochimiques ainsi que des essais biologiques et pharmacologiques. Cette initiative peut évaluer et apporter des preuves scientifiques sur les vertus de cette plante en médecine traditionnelle.

L'étude histologique nous a permis d'identifier les sites de sécrétion et de stockage de l'huile essentielle qui sont les poils sécréteurs à tête vésiculaire.

Le criblage phytochimique effectués sur la poudre et l'extrait aqueux des feuilles de *Melissa officinalis* ont révélé la présence des tanins, des saponosides, des alcaloïdes et des flavonoïdes. Les extractions réalisées ont permis de quantifier une teneur de 4,53% en tanins, 0,43% d'hétérosides flavoniques et 0,20% d'huile essentielle.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau, a démontré la richesse de cette fraction volatile étudiée en sesquiterpènes hydrocarbonés (Trans β -Caryophyllène à 19,25%).

L'activité antioxydante par le test DPPH a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de la mélisse exerce un excellent pouvoir réducteur avec une IC₅₀ de 0,066±0,003 mg/ml et une modeste activité de l'huile essentielle avec une IC₅₀ de 0,64±0,01 mg/ml.

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits de *Melissa officinalis* L. a révélé une grande action inhibitrice sur la croissance des germes pathogènes en milieu gélosé, notamment l'effet de l'huile essentielle contre les souches: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* avec une inhibition comprise entre 16 et 45mm.

L'évaluation des activités pharmacologiques testées *in vivo* a révélé que l'huile essentielle est douée d'un bon effet anti-inflammatoire avec un pourcentage de réduction de l'œdème dépassant les 50% et un excellent effet antispasmodique avec un pourcentage de protection allant de 60 à 76%.

Mots clés : *Melissa officinalis* L. ; effet antioxydant ; effet antimicrobien ; effet anti-inflammatoire ; effet antispasmodique

ABSTRACT

This study focuses on the valorization of a plant used in Algerian popular medicine and belonging to the family of Lamiaceae : *Melissa officinalis* L. The work concerns the ethnobotanic investigations carried out into the field, and the determination of several biochemical characteristics as well as biological and pharmacological tests. This initiative can evaluate and provide scientific evidence on the virtues of this plant in traditional medicine.

The histological study allowed us to identify the secretion and storage sites of the essential oil, which are the secretory fur hair with a vesicular head.

Phytochemical screening of the powder and aqueous extract of *Melissa officinalis* leaves revealed the presence of tannins, saponosides, alkaloids and flavonoids. The extractions carried out enabled us to quantify 4.53% of tannins, 0.43% of flavonic glycosides and 0.20% of essential oil.

The analysis of the chemical composition of the essential oil extracted by steam distillation demonstrated the richness of this volatile fraction studied in hydrocarbon sesquiterpenes (Trans β -Caryophyllene at 19.25%).

The antioxidant activity by the DPPH test has shown that the methanolic extract of the leaves of lemon balm has an excellent reducing power with an IC50 of 0.066 ± 0.003 mg / ml and a modest activity of the essential oil with an IC50 of 0.64 ± 0.01 mg / ml.

The study of the antimicrobial activity of extracts of *Melissa officinalis* L. revealed a great inhibitory action on the growth of pathogenic germs in agar medium, notably the effect of the essential oil against strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*.

The evaluation of the pharmacological activities tested *in vivo* revealed that the essential oil is endowed with a good anti-inflammatory effect with a percentage of reduction of the edema exceeding 50% and an excellent antispasmodic effect with a percentage of protection ranging from 60 to 76%.

Key words : *Melissa officinalis* L. ; antioxydant effect ; antimicrobial effect ; anti-inflammatory effect; antispasmodic effect

ملخص

ترتكز هذه الدراسة على تثمين نبتة طبية جد مستعملة في الطب الشعبي الجزائري تنتمي إلى عائلة Lamiacées و يتعلق الأمر بنبتة الترناجان (*Melissa officinalis* L.) حيث تم من خلال هذا البحث إجراء مسح إثنونباتي "بتحريات ميدانية و تحديد بعض الخصائص الكيميائية الحيوية وكذلك الاختبارات البيولوجية والدوائية. ويمكن لهذه المبادرة تقييم وتقديم أدلة علمية على فضائل هذه النبتة في الطب التقليدي.

سمحت الدراسة النسيجية لنا بتحديد مواقع إفراز وتخزين الزيت العطري، والتي هي الشعيرات الإفرازية ذات الرؤوس الحويصلية.

وكشف الفحص الكيميائي للمسحوق والمستخلص المائي من أوراق ميليسا وجود العفص، الصابونويدات، القلويدات والفلافونويدات.

وأُتاحت عمليات الاستخراج التي أجريت القيام بتحديد كمية 4,53% من الدباغ، و 0,43% من السكريات الفلافينية غير المتجانسة و 0,20% من الزيت العطري.

وأظهر تحليل التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخرجة عن طريق التقطير بالبخار ثراء هذا ال زيت المدروس بللهيدروكربونات السيسكيتربينية (ترانس- β -كاريوفيلين بنسبة 19,25%).

وقد أظهرت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة من خلال اختبار DPPH أن مستخلص الميثانوليك لأوراق نبتة الترناجان لديه قدرة ممتازة على تقليل نسبة تركيز IC_{50} من $0,066 \pm 0,003$ ملغ / مل ونشاط متواضع من الزيت العطري مع IC_{50} من $0,64 \pm 0,01$ ملغ / مل.

كما كشفت دراسة الفعالية ضد الميكروبات لمستخلصات نبتة الترناجان (*Melissa officinalis* L.) تأثير كبير مثبت على نمو الجراثيم المسببة للأمراض في وسط آجار، ولا سيما أثر الزيت الأساسية ضد سلالات: الإشريكية القولونية، بسيودوموناس إيروجينوسا، المكورات العنقودية الذهبية، العسوية الرقيقة والمبيضات البيض.

تقييم الأنشطة الدوائية التي تم اختبارها في الجسم الحي كشفت أن الزيت الأساسي له تأثير جيد مضاد للالتهابات مع نسبة من تخفيض وذمة تتجاوز 50% وتأثير مضاد للتشنج ممتازة مع نسبة من الحماية تتراوح بين من 60 إلى 76%.

الكلمات المفتاح: *Melissa officinalis* L.، الأثر المضاد للأكسدة، الأثر المضاد للجراثيم، الأثر المضاد للالتهابات، الأثر المضاد للتشنج

DEDICACES



Avec une énorme joie je dédie ce modeste travail aux plus chères personnes de ma vie " mes parents ", pour leur sacrifice, prières et encouragements et l'appui qu'ils m'ont apporté. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses

A mes frères et sœurs, sans oublier l'adorable Ahlem

A mes chères amies et collègues

A ceux que j'aime et qui sont chers à mon cœur

En témoignage d'une profonde affection et d'une forte sympathie.

SOUAD



REMERCIEMENTS

Merci infiniment à Dieu " tout puissant " de m'avoir accordé courage, force et volonté pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements et ma vive reconnaissance à la personne sans qui je ne serais jamais arrivée au bout de mes peines : Madame le Professeur SAIDI F., ma directrice de thèse, pour ses conseils bienveillants et son aide en toutes circonstances, qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude.

J'ai l'honneur d'exprimer ma profonde reconnaissance à Mme TAIL G., Professeur à l'université de Blida-1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie très respectueusement Dr HAMAIDI-CHERGUI F. de l'université de Blida-1, Pr BELHADJ S. de l'université Ziane Achour de Djelfa, ainsi que Pr SMAÏL SAADOUN N. et Pr HOUALI K. de l'université Mouloud Maaméri de Tizi-Ouzou, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Particulièrement je remercie mes collègues, Mr BERGOUG Dj., Mr BELREKA O., Mr HAMI S.A., Mme OULAD KOUIDER M., Mme HALIL T. et Mme BRAKNI Kh. qui m'ont aidé à poursuivre mes études tout en exerçant ma profession, pour cela je leur en serais toujours gré.

Mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance sont exprimés à Mr. HAINE M. pour sa gentillesse et son aide précieuse ainsi qu'à l'ensemble des enseignants et personnel du département de Chimie Industrielle à l'université de Blida-1.

Je tiens également à remercier vivement tous l'ensemble du personnel du parc national de Chréa pour leurs aides et leurs grandes sympathies en particulier Mme BOUGHANEM Dj., Mr MEDJEBAR Y. et Mr SAÏD.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble du personnel du laboratoire central de recherche de la police scientifique et technique d'Alger, les laboratoires du complexe Antibiotique « SAÏDAL » à Médéa, laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida et les laboratoires des facultés de biologie et d'agronomie de l'université de Blida-1.

Un grand merci est adressé au personnel de la bibliothèque de la faculté de S.N.V. et particulièrement Melle IHCEN, pour sa bonne humeur et son extrême gentillesse.

Je n'oublierai pas de remercier mes camarades de promotion Mme Boulaghmane F., Mme Benouaklil F., Mme Chaabane D., Melle Miliani A. et Mme Boukhalfoune L. pour l'aide, l'amitié et les moments forts que nous avons vécus ensemble.

Enfin je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué à ma formation.



TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	8
INTRODUCTION GENERALE	11
Chapitre1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
Partie1.1. Généralités sur la plante étudiée	13
1.1.1. Historique	13
1.1.2. Classification botanique	14
1.1.3. Etymologie et dénominations vernaculaires	15
1.1.4. Description botanique de la plante	16
1.1.5. Répartition géographique	18
1.1.6. Culture	19
1.1.7. Récolte	19
1.1.8. Conservation	20
1.1.9. Composition phytochimique et principes actifs	20
1.1.10. Les vertus thérapeutiques de la mélisse	23
Partie1.2. Les activités biologiques et pharmacologiques étudiées	25
1.2.1. Activité antimicrobienne	25
1.2.2. Activité antioxydante	28
1.2.3. Activité anti-inflammatoire	29
1.2.4. Activité antalgique	30
Chapitre 2. MATERIEL ET METHODES	32
Partie 2.1. Matériel d'études	32

2.1.1. Matériel végétal	32
2.1.2. Matériel bactériologique	32
2.1.3. Matériel animal	33
2.1.4. Matériel non biologique	33
Partie 2.2 .Méthodes	34
2.2.1. Etude ethnobotanique	34
2.2.2. Etude macroscopique et microscopique	35
2.2.3. Etude phytochimique	38
2.2.3.1. Screening phytochimique	38
2.2.3.2. Extraction des tanins et flavonoides	40
2.2.3.3. Etude des composés non volatils polaires et apolaires	43
2.2.3.3.1. Extraction au Soxhlet	43
2.2.3.3.2. Analyse spectrophotométrique	44
2.2.3.4. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles	45
2.2.3.4.1. Extraction et détermination du rendement en huile essentielle	45
2.2.3.4.2. Contrôle analytique de l'huile essentielle	46
2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	51
2.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	53
2.2.6. Etude de l'activité anti-inflammatoire	57
2.2.7. Etude de l'activité antispasmodique	59
Chapitre 3. RESULTATS ET DISCUSSION	62
Partie 3.1. Résultats de l'étude ethnobotanique de <i>Melissa officinalis</i> L.	62
Partie 3.2. Résultats de l'étude macroscopique et microscopique	71
Partie 3.3. Résultats de l'étude phytochimique	78
Partie 3.4. Résultats de l'étude de l'activité antioxydante	98
Partie 3.5. Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne	105
Partie 3.6. Résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoire	111
Partie 3.7. Résultats de l'étude de l'activité antispasmodique	116
CONCLUSION GENERALE	121
APPENDICES	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Vue générale de <i>Melissa officinalis</i> L.	16
Figure 1.2: Regroupement des fleurs de <i>Melissa officinalis</i> L.	18
Figure 2.1 : Schémas résumant les principales étapes de réalisation des coupes histologiques par le microtome	36
Figure 2.2 : Technique de la double coloration	37
Figure 2.3. Schémas d'un extracteur de Soxhlet	43
Figure 3.1 : Répartition géographique de la population interrogée	63
Figure 3.2 : Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie	63
Figure 3.3 : Pourcentage des utilisateurs de la phytothérapie	64
Figure 3.4 : Pourcentage des connaisseurs de la mélisse	65
Figure 3.5: Pourcentage des sources de connaissances	65
Figure 3.6 : Pourcentage des cas d'utilisations de la mélisse	66
Figure 3.7 : Pourcentage des parties utilisées de la plante	67
Figure 3.8 : Pourcentage des résultats d'utilisation de la mélisse	68
Figure 3.9 : Pourcentage des effets secondaires	69
Figure 3.10 : Pourcentage des traitements adoptés par les personnes interrogées	70
Figure 3.11: Observation d'une partie de la tige à la loupe Gx2.5	71
Figure 3.12: Observation de la feuille à la loupe binoculaire	72
Figure 3.13: Observation de la fleur à la loupe binoculaire Gx4.5	72
Figure 3.14: Observation de l'ovaire à la loupe binoculaire Gx4.5	73
Figure 3.15: Observation des organes de la fleur à la loupe binoculaire Gx4.5	73
Figure 3.16: Observation d'une graine à la loupe binoculaire Gx4.5	73
Figure 3.17: Coupe histologique de la tige de <i>M. officinalis</i> Gx10	74
Figure 3.18: Coupe transversale au niveau de la tige de <i>M. officinalis</i> Gx10	74
Figure 3.19 : Mise en évidence des poils épidermiques au niveau de la tige	75
Figure 3.20: Observation des poils épidermiques au niveau de la feuille de <i>M. officinalis</i> Gx10	76

Figure 3.21: Coupe histologique au niveau du pétiole de <i>M. officinalis</i> Gx40	77
Figure 3.22: Teneur en composés apolaires et polaires de <i>M. officinalis</i> L.	81
Figure 3.23 : Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de <i>M. officinalis</i> L.	82
Figure 3.24: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de <i>M. officinalis</i> L.	83
Figure 3.25: Chromatogramme de l'HE de <i>M. officinalis</i> L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG/SM	91
Figure 3.26: Spectre de Trans (Beta) caryophyllène	92
Figure 3.27: Spectre de masse de l'oxyde de caryophyllène	92
Figure 3.28: Spectre de masse de caryophyllénol II	93
Figure 3.29: Evolution de l'absorbance des solutions des témoins et l'HE de la mélisse	98
Figure 3.30: Evolution de l'absorbance des solutions des témoins et l'extrait méthanolique de la mélisse	99
Figure 3.31: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des témoins testés et de l'HE de la mélisse	99
Figure 3.32: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire du témoin et l'extrait méthanolique de la mélisse	100
Figure 3.33: Concentration inhibitrice à 50% de l'HE de la mélisse et le toco	101
Figure 3.34: Concentration inhibitrice à 50% de l'extrait méthanolique et le BHT	101
Figure 3.35 : Activité antimicrobienne des extraits de la mélisse	107
Figure 3.36 : Variation du pourcentage d'augmentation d'œdème	112
Figure 3.37 : Variation du pourcentage de réduction d'œdème	113
Figure 3.38 : Pourcentage de protection moyen des trois lots traités	117
Tableau 2.1: Coordonnées géographiques du site de récolte de <i>M.officinalis</i>	32
Tableau 2.2 : Les souches microbiennes	54
Tableau 2.3: Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition	56
Tableau 3.1:Le criblage phytochimique de <i>Melissa officinalis</i> L.	78
Tableau 3.2: Résultats de la teneur en tanins	79
Tableau 3.3: Résultats de la teneur en flavonoïdes	80
Tableau 3.4: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires	81
Tableau 3.5: Résultats du rendement en HE	84

Tableau 3.6: Caractéristiques organoleptiques de l'HE	86
Tableau 3.7: Résultats des indices physiques	87
Tableau 3.8: Résultats des indices chimiques	89
Tableau 3.9: Composés de l'HE de <i>M. officinalis</i> identifiés par CG/SM	94
Tableau 3.10: Teneurs des principales familles de constituants de l'HE de <i>M. officinalis</i> selon chaque étude	95
Tableau 3.11: Variation des principaux constituants de l'HE de <i>M. officinalis</i> selon différentes origine	96
Tableau 3.12: Puissance antioxydante de différentes substances testées	102
Tableau 3.13: Résultats de l'antibiogramme	104
Tableau 3.14: Résultats de l'aromatogramme	106
Tableau 3.15: Effet de l'extrait polaire de <i>Melissa officinalis</i> L. sur les souches microbiennes	107
Tableau 3.16 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'HE de <i>M. officinalis</i>	111
Tableau 3.17 : Evaluation de l'effet antispasmodique de l'HE de <i>M. officinalis</i>	116

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Depuis la période préhistorique, les plantes ont été à la base de plusieurs thérapies. Les médecins et les pharmaciens prescrivaient ou vendaient environ 90% de produits à base de plantes [1].

De nos jours l'association entre la chimie, la biochimie, la biologie, la médecine, la pharmacie et la botanique est un assemblage que personne ne peut contester. Les plantes identifiées et classifiées par les botanistes sont devenues la matière première de prédilection pour de nouvelles prospections pharmaceutiques. Les remèdes à base de plantes ont un immense avantage par rapport au traitement chimique, de ce fait, et à l'instar de nombreux pays, l'Algérie accumule des données d'expériences sur l'usage des remèdes d'origines naturelles, lesquels ne sont pas nécessairement sans danger, du simple fait qu'ils soient naturels [2].

Les recherches ont montré que les plantes médicinales comportent une richesse dans les constituants qui sont élaborés mais à des concentrations variables. Ces constituants ont de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont appelés « principes actifs » ou métabolites secondaires et peuvent être des minéraux, glycosides, résines, huiles essentielles ou alcaloïdes [3].

La préservation et la valorisation des ressources naturelles à intérêt médicinale et aromatique sont devenues des domaines très importants sur le plan économique [4]. De nos jours l'utilisation des plantes en médecine a évolué : les médicaments sont aujourd'hui le fruit d'une recherche longue et coûteuse qui passe de la cueillette au laboratoire, à la détermination du principe actif, son isolation ensuite la synthèse [5].

Notre travail s'inscrit dans cette dynamique, ayant pour but l'étude d'une plante médicinale largement utilisée en médecine populaire pour ses effets antispasmodique et calmant [6].

Nous nous sommes intéressées à *Melissa officinalis* L. connue sous le nom de Ferzizoua ou Trandjan. Elle appartient à la famille des Lamiaceae, localisée principalement au Nord du pays.

Melissa officinalis est une plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs [7]. Elle sert de remède médicinal depuis plus de 2000 ans [8]. Pline, dans son ouvrage *Naturalis historia*, et Dioscoride dans *Materia medica* ont été les premiers à rendre compte de l'action thérapeutique de la plante qui était surtout employée comme remède cardiaque et gastrique [9].

Ainsi, dans le cadre des travaux du laboratoire de recherche de biotechnologies, environnement et santé, les objectifs que nous nous sommes assignées à travers cette étude, concernent :

- Le volet Ethnobotanique, qui permet de vulgariser la connaissance de *Melissa officinalis* L., son utilisation par les spécialistes et l'étendue de son impact sur la population (ou une partie) algérienne, en effectuant des enquêtes sur terrain ;
- Le volet histologique par l'étude macroscopique et microscopique de la plante ;
- Le volet biochimique, par l'identification et la caractérisation des métabolites secondaires ainsi que la détermination des principaux principes actifs de la plante ;
- Evaluation des activités biologiques *in vitro*, à savoir l'effet antioxydant et l'activité antimicrobienne ou du moins des essais préliminaires sur les effets antiseptiques de *Melissa officinalis* L. ;
- Etude des activités pharmacologiques *in vivo*, par évaluation des effets anti-inflammatoire et antispasmodique de la plante.

CHAPITRE 1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1.1

Généralités sur la plante étudiée

1.1.1. Historique

Melissa officinalis a été importée en Espagne au X^e siècle grâce aux Arabes et plus tard en Europe Centrale par l'intermédiaire des moines bénédictins [4].

Vers le X^e siècle, Avicenne vantait son pouvoir cordial « qui réjouit le cœur » ainsi que son remède contre la mélancolie [8].

Les feuilles de mélisse ont été utilisées traditionnellement depuis Théophraste (372 - 287 av. J.-C.) et Hippocrate (460 – 377 av. J.-C.), puis au XV^e siècle par Paracelse (1493 - 1541), pour améliorer les fonctions digestives et réduire les états de nervosité [10].

Le philosophe, écrivain et médecin perse Avicenne (980-1037) la recommandait pour renforcer le cœur, et disait-il, « elle rend le cœur joyeux » par la suite, il découvrit son action positive sur le tube digestif [9].

L'écrivain anglais John Evelyn (1541 - 1620) a décrit la mélisse comme une plante qui structure le cerveau, renforce la santé mentale et supprime la mélancolie [11].

Du XV^e au XVII^e siècle on utilisait principalement le distillat (eau de mélisse). Il correspond à un alcoolat distillé de mélisse. Ce dernier, associé au citron, la cannelle, la coriandre, le clou de girofle et la muscade est utilisé comme antispasmodique et stomachique [7, 4, 12].

1.1.2. Classification botanique

1.1.2.1. Famille des lamiacées

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou anciennement labiées (Labiatae) du Latin (Labia) « lèvre » signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres [13, 14], est l'une des familles les plus répandues dans le règne végétal avec plus de 7200 espèces réparties en environ 240 genres et 7 sous-familles [15]. Elles se répartissent sur tout le globe, mais principalement du bassin méditerranéen à l'Asie Centrale [16, 17].

Cette famille est l'une des premières à être distinguée par les botanistes et ceci par la particularité de ses caractères [16]. Ses espèces se trouvent sous forme de plantes herbacées ou arbustes, très rarement arbres ou lianes avec une tige très souvent quadrangulaire. L'inflorescence est en cymes axillaires, le calice souvent bilabié avec une corolle toujours tubuleuse plus ou moins bilabée [19].

Les Lamiacées possèdent une place économique importante en raison de leurs utilisations médicinales, culinaires et cosmétiques [20, 21].

1.1.2.2. Genre Melissa

Melissa est un genre de la famille des lamiacées, il comprend une seule espèce *Melissa officinalis* L.

Il existe trois sous-espèces qui sont des cultivars de la première sous-espèce citée [4, 22], mais c'est la sous-espèce *officinalis* qui est utilisée en thérapeutique [23].

1.1.2.3. Systématique et synonymes botaniques

La place de la mélisse dans la classification phylogénétique APG III « Angiosperm Phyllogeny Group » (2009) est la suivante [24, 25, 26, 27]:

Règne: *Plantae*

Sous-Règne: *Tracheobionta*

Division : *Spermatophyta*

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Sous-Classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Melissa*

Genre et Espèce : *Melissa officinalis*

Un des synonymes de son nom d'espèce est *Melissa citriodorata* [6].

1.1.3. Etymologie et dénominations vernaculaires

Le nom de la mélisse dérive de sa racine indo-européenne, *mel*, qui signifie miel. En effet, la mélisse présente l'une des meilleures plantes mellifères. Dans son ouvrage « *Historia plantarum* » le grec Théophraste la dénommait « *melissophyllon* », étymologiquement « feuilles à abeilles » [28, 4].

Ses dénominations font référence au parfum citronné qu'elle dégage lorsqu'on froisse ses feuilles [29]. Les apiculteurs des abords de la méditerranée avaient l'habitude d'en enduire les ruches afin que les abeilles ouvrières ne s'éloignent pas de leur demeure [30].

La mélisse est connue sous différentes dénominations vernaculaires:

- ✓ Berbère : Ferzizoua (feuille d'abeille), lfer-zizwa, Tiffer n-tzizua (aile d'abeille), Taneqilet merzizua [6].
- ✓ Arabe : Trindjan, Touroudjan, Hbaq t-trunj, Bararendjabouya, Merzizou [31, 6].
- ✓ Français : Citronnelle, Céline, Citronnade, Piment des abeilles, Thé de France, Poincirade [32, 33].
- ✓ Anglais : Lemon balm, Bee balm, Sweet lemon ou Cure-all [4, 24].

- ✓ Allemand : Melisse, Zitronen-Melisse, Zitronenkraut, Citronelle, Bienenkraut, Honigblatt ou Melissenblätter [4, 24].

1.1.4. Description botanique de la plante

Il s'agit d'une plante herbacée touffue (Figure 1.1), robuste et vivace, à rhizome court. Ce dernier porte de nombreux bourgeons adventifs qui servent à perpétuer et à multiplier la plante [4].

Elle est mollement hispide (possède des poils drus, mous et épais), au toucher elle est rugueuse. Elle est aromatique et très parfumée. Sa saveur est chaude, aromatique et légèrement amère [16, 6].

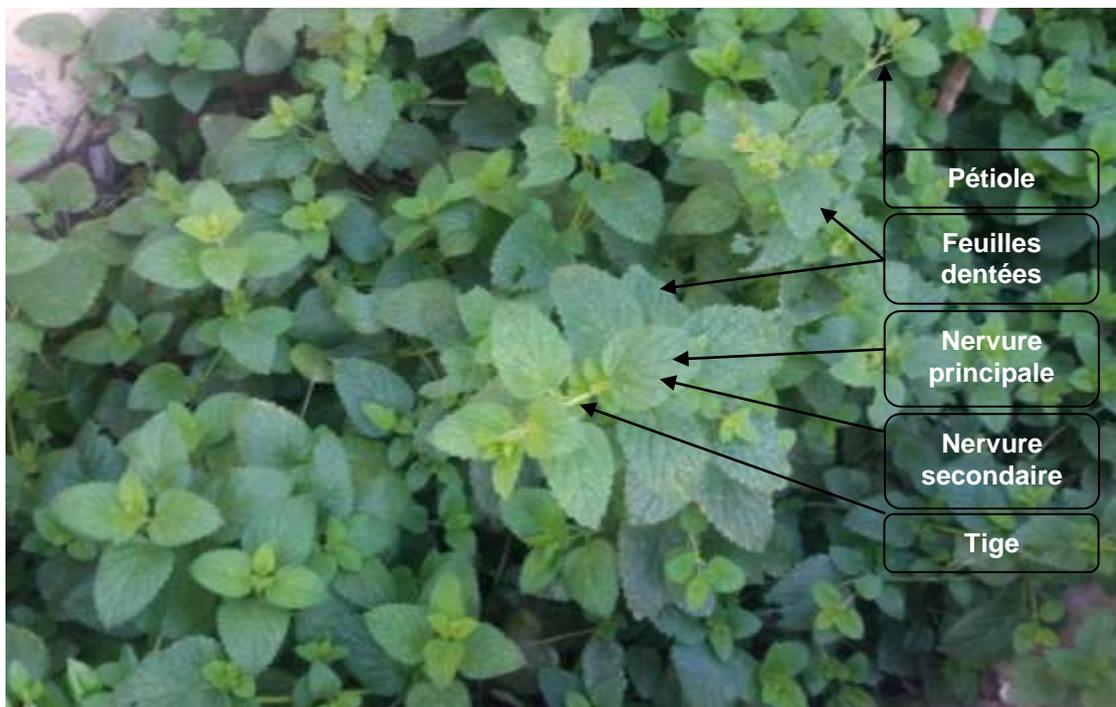


Figure 1.1: Vue générale de *Melissa officinalis* L. (originale)

a/ Tiges

Elles sont dressées, très rameuses et érigées, à section quadrangulaire [34]. Elles sont ramifiées, glabres ou clairsemées de poils. Elles peuvent atteindre jusqu'à 90 cm de haut [4, 16].

b/ Feuilles

Elles sont plus ou moins pétiolées. Elles mesurent environ 8 cm de long et 5 cm de large. Elles sont largement ovoïdes, arrondies et presque cordiformes à la base. Elles sont opposées et décussées sur la tige. Le limbe fin, légèrement ridé, est de couleur vert foncé (parfois vert clair un peu jaunâtre) sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure. La fine nervure est fortement proéminente sur la face inférieure. Le bord de la feuille est irrégulièrement crénelé, dentelé et finement cilié. La face supérieure de la feuille est gaufrée, elle est faiblement pubescente. La face inférieure est presque glabre ou légèrement pubescente le long des nervures, mais finement ponctuée [10].

c/ Fleurs

Elles sont regroupées en 3 à 5 faux verticilles assez compacts, mais espacés les uns des autres. Ces derniers sont placés sur des rameaux beaucoup plus courts que la feuille, à l'aisselle de laquelle s'insère le verticille (Figure 1.2).

Le calice est en forme de clochette tubuleuse, très velu, de 7 à 8 mm de long. Il est bilabié. La lèvre supérieure présente 3 dents courtes (tridentée) et porte des nervures en réseau. La lèvre inférieure est formée de 2 dents qui remontent en arête (bifide).

La corolle est tubuleuse, de 8 à 15 mm de long. Au stade bouton, elle est de couleur jaunâtre mais après épanouissement elle prend une couleur blanche. Elle présente un tube légèrement recourbé et un limbe à deux lèvres inégales. La lèvre supérieure est dressée et bifide alors que la lèvre inférieure est à 3 lobes obtus. Le lobe médian étant le plus long.

Les étamines sont au nombre de 4 et fusionnent ensemble vers le haut. L'ovaire est supère et comprend 2 loges qui renferment chacune 2 ovules [4, 6, 7, 31, 35, 36, 37, 38, 39].

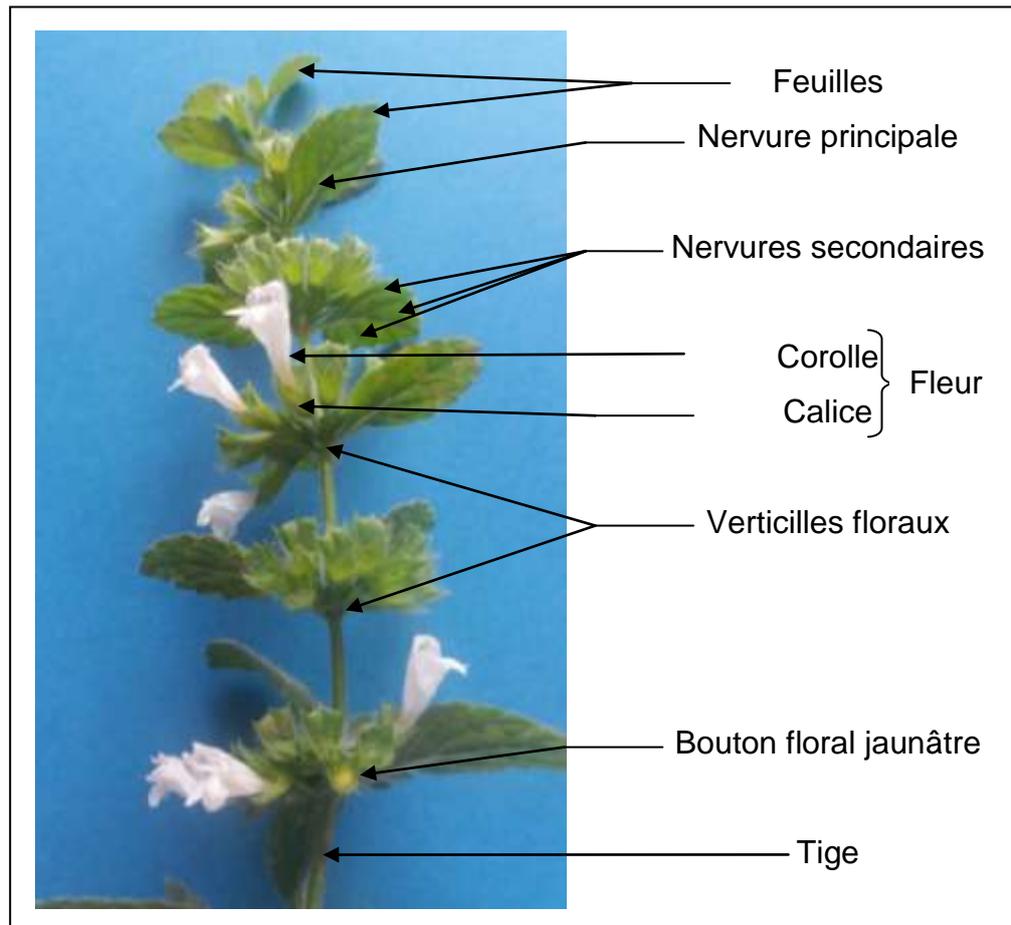


Figure 1.2: Le regroupement des fleurs de *Melissa officinalis* L. (Originale)

d/ Fruit

Il est visible au fond du calice persistant. C'est un tétrakène, d'environ 2 mm de long. Il est formé de 4 parties lors du développement de fausses cloisons [34]. Il est lisse de couleur châtain, et il est formé d'éléments ovoïdes. Les graines sont luisantes, de couleur brun-noir [6, 4].

1.1.5. Répartition géographique

a/ Dans le monde

Initialement originaire de la méditerranée orientale (Balkans et Asie mineur) et de l'Asie occidentale ; la plante est rarement spontanée. Elle se rencontre aussi dans le midi de la France, le sud de l'Allemagne, en Europe occidentale et particulièrement en Espagne et aussi en Amérique du Nord [40, 41, 42, 43, 44, 45].

C'est une espèce spontanée dans l'Atlas marocain, notamment dans la région d'Agadir. On la trouve également en Tunisie [6, 46].

D'une manière générale, elle croît préférentiellement dans les buissons, les lieux rudéraux humides, frais et ombragés et les bois [7, 40, 46].

b/ En Algérie

La mélisse est cultivée dans les régions de la Kabylie. Néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du Tell, où elle est signalée comme assez rare jusqu'en 1962. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen, les décombres, les endroits frais et les forêts, ainsi qu'aux alentours des maisons [6, 31, 12, 47].

1.1.6. Culture

La mélisse demande un sol profond, lourd et riche en éléments nutritifs, bien travaillé et bien fumé. La culture de la mélisse demande une exposition ensoleillée et abritée [48]. Elle pousse dans des endroits très ombrés [49].

Elle est peu tolérante et ne doit pas être cultivée auprès d'autres Lamiacées [4].

La multiplication se fait par semis printaniers ou par division du rhizome [48]. Cette plante se ressème souvent seule [50].

La mélisse est sensible au gel et doit, de ce fait, être couverte durant l'hiver [48]. Elle est très sensible à une rouille des feuilles « *Septoria melissae Deson* » et à l'attaque par les escargots [49].

1.1.7. Récolte

La floraison se produit généralement à la deuxième année et s'étale de Juin à Septembre [4, 38].

Pour la conservation des feuilles séchées, la récolte de la tige feuillée s'effectue avant la floraison. Les tiges garnies de feuilles sont coupées tout en les débarrassant des impuretés. Ensuite, elles sont séchées rapidement à l'ombre dans un endroit frais à l'abri de la poussière. Le séchage de la plante doit être effectué sitôt la cueillette terminée car la plante s'abîme très rapidement [6, 51].

1.1.8. Conservation

Les feuilles fraîches peuvent être conservées quelques jours dans un sac plastique placé au réfrigérateur.

La plante séchée doit être stockée dans des récipients hermétiques (en verre ou en porcelaine), à l'abri de l'humidité et de la lumière (pour éviter la cyclisation du citronellal) [4, 12].

1.1.9. Composition phytochimique et principes actifs

1.1.9.1. Huile essentielle

1.1.9.1.1. Définition

En se référant à la norme française NF T 75-006, l'HE est définie comme «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur ou par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus » [52].

Selon la pharmacopée européenne, ce sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [53, 54].

Les HE sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme «huile» s'explique par la propriété des HE à se solubiliser dans les graisses. Le terme «essentielle» fait référence à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante [55].

1.1.9.1.2. Propriétés pharmacologiques

a) Activité antiseptique : les huiles essentielles ont une activité antiseptique contre diverses bactéries pathogènes notamment les souches résistantes aux antibiotiques. Certaines huiles essentielles sont actives contre les levures et les champignons responsables des mycoses [53].

b) Propriétés spasmolytiques et sédatives : un grand nombre de plantes à huiles essentielles sont connues pour être efficaces dans la réduction ou la suppression de spasmes gastriques. Elles stimulent les sécrétions gastriques et améliorent la digestion. Aussi conduisent-elles à une diminution des troubles du sommeil, des troubles nerveux ou autres troubles psychosomatiques [53].

Hormis ces propriétés souvent communes, chaque huile peut présenter une ou plusieurs actions thérapeutiques plus spécifiques, parmi lesquelles : des

propriétés cicatrisantes, améliore la circulation du sang, anti-inflammatoires, antirhumatismales, immunostimulantes, hormonales antitumorales [56].

Les HE peuvent servir à désintoxiquer en éliminant les toxines, néanmoins, certaines HE présentent des propriétés irritantes [53, 57].

1.1.9.1.3. Composition des HE de la mélisse

La teneur de la mélisse en HE varie de 0,05 à 0,3 %. Elle renferme majoritairement du citral (mélange de géraniol = citral a et de néral = citral b) et du citronellal. Ces deux terpènes sont responsables de l'odeur et de la saveur de la mélisse.

Elle renferme également d'autres constituants minoritaires : β -caryophyllène dont la teneur peut atteindre jusqu'à 28% et au cours de la conservation elle se transforme en époxydes de β -caryophyllène I et II, germacrène D (jusqu'à 15%, mais pouvant aussi être absent), 6-méthylhept-5-ène-2-one (jusqu'à 9%), acétate de géranyle (jusqu'à 6%), α -copaène (jusqu'à 5%), nérol (jusqu'à 5%), méthylcitronellal (jusqu'à 5%, mais pouvant être absent) et géraniol.

L'HE renferme également des composés volatils présents sous formes hétérosidiques comme des glycosides de citronellol, de phényléthanol, d'eugénol, de benzylalcool et d'oct-1-én-3-ol [10, 4].

1.1.9.2. Tanins

1.1.9.2.1. Définition

Les tanins sont des mélanges complexes de polyphénols. Le principe actif est un phénol qui se combine avec les sucres.

Ce sont des substances amorphes, extraites de plantes. Elles sont utilisées principalement pour le tannage du cuir. Les meilleurs tanins sont issus de la noix de galle du chêne et des feuilles du sumac.

1.1.9.2.2. Les propriétés des tanins

Leur propriété principale est l'astringence tant en usage interne qu'en usage externe. Il est démontré que les tanins possèdent des activités antimicrobiennes, antivirales et hypoglycémiantes. Ils sont utilisés comme contre-poison des métaux

lourds et des alcaloïdes. Ils s'utilisent dans l'industrie mais plus particulièrement dans celle du cuir, des vernis et peintures. En pharmacie, leur action astringente est utilisée comme antidiarrhéique, hémostatique, vasoconstricteur, protecteur veineux dans le traitement des hémorroïdes et des varices. En cosmétologie, les tanins s'utilisent sous forme de lotions astringentes [58].

Les tanins ont également une activité anti-oxydante. Ce sont des inhibiteurs enzymatiques aspécifiques. Leur surconsommation peut cependant engendrer peu à peu une anémie de type hémolytique [53, 10].

1.1.9.2.3. Composition de la mélisse en tanins

Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique sont appelés aussi tanins de lamiacées. Leur teneur au niveau de la mélisse peut atteindre jusqu'à 7 %. Ils renferment l'acide rosmarinique, les acides caféique et chlorogénique, le 2-(3',4'-dihydroxyphényl)-1,3-benzodioxol-5-aldéhyde et les acides méltriniques A et B (trimères de l'acide caféique) [4].

1.1.9.3. Flavonoïdes

1.1.9.3.1. Définition

Les flavonoïdes ou phénylchromones sont des substances polyphénoliques possédant un certain nombre de phénols libres ou stabilisés par un sucre. Ce sont des hétérosides très répandus chez certaines dicotylédones. Ils sont présents dans tous les organes principalement dans les feuilles et les boutons floraux. Ce sont des pigments jaunes utilisés comme teinture pour les tissus [58].

1.1.9.3.2. Propriétés pharmacologiques

Les flavonoïdes sont essentiellement utilisés dans le domaine capillaro-veineux. Seuls ou associés à d'autres composés, ils constituent des vasculoprotecteurs et des veinotoniques. Ils agissent par diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (action vitaminique P) [58].

Ils sont connus pour leur activité anti-oxydante et anti-inflammatoire [53].

Ils sont indiqués principalement dans le traitement des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau (pétéchies, ecchymoses) ainsi qu'au niveau des

muqueuses (épistaxis, gingivorragies). Ils sont recommandés dans le traitement des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire, dans celui des métrorragies liées aux dispositifs intra-utérins et des troubles liés à la circulation rétinienne et/ou chroïdienne en association avec d'autres médicaments. Enfin, ils sont utilisés dans le traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolympatique : œdèmes, paresthésies, crampes, jambes lourdes [58, 53].

1.1.9.3.3. Composition de la mélisse en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes se situe entre 0,2 % et 0,7 %. Il s'agit des hétérosides de lutéoline, d'apigénine, de quercétine, de kaempférol, comme le lutéoline-3'-glucuronide, le cynaroside (lutéoline-7-O- glucoside), l'isoquercitrin (quercétine-3-O-glucoside), la cosmosiine (apigénine-7-O-glucoside) ainsi que l'rahmnazine (3,7-diméthoxykaempférol) et le 7-méthoxykaempférol [4].

1.1.9.4. Autres composés minoritaires

Outre les composés majoritaires de la mélisse, elle contient :

- Dérivés hydroxycoumariniques: ésculitine [4].
- Acides triterpéniques, notamment les acides ursolique ($\approx 0,3$ %) et oléanolique [4].
- Les vitamines : La mélisse contient de la vitamine C, de la vitamine E et du bêta-carotène [30].

1.1.10. Les vertus thérapeutiques de la mélisse

1.1.10.1. Utilisations

On dit que la mélisse a la force de quinze plantes et qu'elle vivifie et renforce le cœur [28].

L'infusion de la même plante peut être utilisée pour nettoyer et tonifier la peau du visage [30].

En cosmétologie, l'extrait alcoolique de mélisse réduit la production de pellicules [6, 48].

1.1.10.2. Doses et modes d'administration

Elle s'utilise sous forme d'infusion, de teinture, de vin médicinal et d'eau antihystérique dans tous les cas où il convient d'intervenir pour calmer les douleurs et les nerfs [51].

On en fait surtout usage en infusion théiforme à raison d'une dose de 1,5 à 4,5g de plante par tasse à boire plusieurs fois par jour [4].

En usage externe, la mélisse réduite en poudre est utilisée comme sternutatoire, contre les maux de tête [31].

Pour soulager les piqûres des insectes, les bleus et les plaies peu profondes, il est recommandé de faire un cataplasme de feuilles écrasées [59].

1.1.10.3. Effets indésirables et contre-indication

Aucun effet secondaire, ni aucune interaction avec d'autres médicaments ou plantes médicinales, n'ont été rapportés à ce jour [60].

Aucune toxicité aiguë ou chronique n'est signalée lorsque la mélisse est utilisée comme condiment ou en infusion, aux doses usuelles. Le potentiel de sensibilisation de la plante est faible. Aucun cas de réaction allergique n'est signalé [4].

Cependant, il est préférable d'en éviter l'usage prolongé du fait de son action antigonadotrope [33].

L'innovation doit faire peur, car ces substances riches en molécules lipophiles ont un tropisme neurologique évident. Rappelons aussi le vieil adage de Paracelse: « C'est la dose qui fait le poison » [4].

Un contact prolongé avec des plantes ou des feuilles de baume peut causer une dermatite de contact (démangeaisons, brûlures, rougeurs ou de la peau boursouflée) ou il peut rendre sensible à d'autres allergènes [4].

Partie 1.2

Les activités biologiques et pharmacologiques étudiées

1.2.1. L'activité antimicrobienne

1.2.1.1. Les antibiotiques

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes. Elles possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes [61]. Elles interviennent sélectivement en perturbant le métabolisme [62] ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier [63, 64]. Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons. Actuellement d'autres produits possèdent la même action antibactérienne, mais sont obtenus par synthèse [62].

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolés, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes) les bêtalactamines, les aminosides, les polypeptides [62, 61]. Chaque antibiotique possède un spectre d'action, qui est la flore microbienne sur laquelle il exerce son activité bactéricide ou bactériostatique, il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre [62, 65].

En raison des résistances multiples possibles et des effets secondaires des antibiotiques synthétiques, une attention croissante a été dirigée vers les antibiotiques naturels. Les chercheurs concentrent leurs efforts pour trouver des substances inhibitrices idéales, de large spectre d'activité, sans effets secondaires et surtout à un prix de revient raisonnable. Le potentiel des plantes aromatiques et médicinales (PAM) pourrait donc jouer un rôle important dans la lutte contre les infections microbiennes [66, 67, 68].

L'ensemble des travaux sur les plantes médicinales préconise leur usage chez l'homme et les animaux, ainsi que dans les industries alimentaires [69].

1.2.1.2. Aromatogramme

Il s'agit d'un antibiogramme réalisé avec des huiles essentielles [70]. Il permet d'étudier *in vitro* le pouvoir bactéricide des essences de plantes aromatiques sur des germes microbiens [71].

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures [72], leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique. La sensibilité des microorganismes peut varier selon le genre testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, bio statique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet [73].

1.2.1.3. Les souches microbiennes utilisées

Afin de tester l'effet antiseptique des extraits de *Melissa officinalis* L., nous avons utilisé un ensemble de souches microbiennes, à savoir :

➤ *Escherichia coli*

Ce sont des bacilles Gram négatif ou « colibacille » appartenant à la famille des enterobacteriaceae. De forme non sporulée, de type anaérobie facultative, elles sont généralement mobiles grâce aux flagelles. Leur longueur varie de 2 à 6 µm, alors que leur largeur se situe de 1,1 à 1,5 µm [74].

Escherichia coli est l'hôte habituel de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud [75, 76, 77].

Les souches d'*E. coli* responsables des infections chez l'homme sont différentes de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale [78].

Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. *E. coli* est le germe responsable de 75 à 80 % des infections urinaires. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [79].

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles aérobies Gram négatif. Ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche. Ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéroplastés. En culture sur gélose, elle produit un pigment bleu-vert soluble dans l'eau.

Elle est présente dans le sol et l'eau. Cette souche est considérée comme un modèle d'agent pathogène opportuniste. Elle est responsable de 10% de l'ensemble des infections nosocomiales [80, 81].

➤ *Staphylococcus aureus*.

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin).

S. aureus est un pathogène important, responsable des infections des plaies, de l'ostéomyélite de l'enfant (infection de l'os), de l'arthrite (infection d'une articulation), septicémie et pneumopathies (multiples petits abcès des deux poumons).

Une toxi-infection alimentaire, avec diarrhée et vomissements rapidement régressif, est parfois provoquée par le staphylocoque (surtout par sa toxine). Les staphylocoques peuvent causer des lésions très diverses, mais les atteintes cutanées sont les plus fréquentes [82, 81].

➤ *Bacillus subtilis*

Ce sont des bactéries Gram positif. Elles produisent des endospores, elles sont très répandues dans le sol et les végétaux et sont généralement considérées comme inoffensives, bien qu'elles causent des maladies d'origine alimentaire [83].

➤ *Candida albicans*

C'est un mycète levuriforme qui croît souvent sur les muqueuses de la bouche, du tractus intestinal et des voies vaginales [83].

1.2.2. Activité antioxydante

1.2.2.1. Définition

C'est la capacité que possède une molécule, de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. De nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des plantes médicinales et des produits agroalimentaires [84, 85, 86, 87].

1.2.2.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération de radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [88]. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [89]. Dans les systèmes vivants, une production physiologique de radicaux libres se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces réactifs est possible. Ce sont les antioxydants qui peuvent empêcher les dégâts cellulaires causés par les radicaux libres de l'oxygène [90].

1.2.2.3. Les radicaux libres

Un radical libre est le produit des réactions d'oxydation du métabolisme cellulaire. Hyperactif chimiquement [91], cette espèce chimique (atome ou molécule) contient un électron non apparié sur son orbitale externe [92]. Elle est comparée à un déchet toxique qu'il faut recycler en permanence [93].

L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives à l'oxygène ERO [92].

Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires et qui se traduit par l'oxydation des lipides membranaires, des protéines cellulaires et des acides nucléiques. Cet effet entraîne la mort cellulaire [94, 95].

1.2.2.4. Les antioxydants

Un antioxydant est défini, comme étant toute substance présente en faible concentration, relative à un substrat oxydable et qui diminue ou prévient l'oxydation de ce substrat [96].

1.2.3. Activité anti-inflammatoire

De nombreuses HE peuvent être utilisées pour traiter ou alléger les processus d'origine inflammatoire [97, 98].

Certains flavonoïdes inhibent la synthèse des prostaglandines, cette action leur confère une activité anti-inflammatoire. Les tanins catéchiques possèdent la propriété de diminuer la perméabilité capillaire, ce qui leur confère une activité anti-inflammatoire [99].

1.2.3.1. La réaction inflammatoire

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères.

Les signes classiques d'une inflammation sont : une rougeur, une chaleur, une douleur et un gonflement [76].

La réaction inflammatoire met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui interviennent à des temps et des degrés variables : réactions biochimiques, activation cellulaire, coagulation, fibrinolyse et qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère. Cependant une activation trop prolongée ou trop importante peut entraîner des altérations plus ou moins définitives [100, 101].

1.2.3.2. Les causes de l'inflammation

Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées : agents infectieux, substance étrangère inerte, agent physique, lésion cyto-tissulaire post-traumatique [102].

Les causes ou les facteurs qui vont déclencher l'inflammation sont multiples et variées. Elles peuvent avoir diverses origines :

- ✓ Causes exogènes :

- Agents physiques : traumatisme, radiations, électricité, froid, chaleur, piquûre, coupure ;
 - Agents chimiques : acide, base, substances minérales diverses ;
 - Agents biologiques : microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon) et d'autres agents comme le vin, le pollen et les toxines [101, 103].
- ✓ Causes endogènes :
- Causes trophiques: elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation ;
 - Conflits immunitaires: rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques [104].

On doit souligner que :

Les micro-organismes infectieux ne constituent qu'une partie des causes de l'inflammation et qu'une réaction inflammatoire n'est donc pas synonyme d'infection.

Un même agent pathogène peut entraîner des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte d'où l'importance des facteurs liés à l'hôte (en particulier l'état des défenses immunitaires). Plusieurs causes peuvent être associées dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

L'inflammation est dite :

- Primaire (ou aiguë) quand elle est de cause immédiate et localisée ;
- Secondaire (ou chronique) lorsqu'elle est plus étendue comme c'est le cas de l'inflammation rhumatismale [105, 106, 107, 108, 109, 110].

1.2.4. Activité antalgique

De nombreuses HE présentent une activité contre tout type de douleurs, d'autres sont connues pour être efficaces contre le stress. Elles peuvent avoir une action sédatrice, relaxante, anticonvulsive ou spasmolytique [111, 112].

1.2.4.1. Définition de la douleur

La douleur est un processus physiologique dont le but est d'avertir la personne d'une menace de son intégrité physique [113].

La définition actuelle de la notion de la douleur a été rendue officielle par l'I.A.S.P. (International Association for the Study of Pain): « la douleur est

l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion ».

Il s'agit d'une sensation spécifique ayant des récepteurs et des conducteurs périphériques et centraux qui lui sont propres [114].

Elle apparaît à la suite d'une inflammation, d'une contraction musculaire, d'un spasme vasculaire ou d'une infection locale [115].

1.2.4.2. Définition d'un spasme

Le spasme est une contraction involontaire des fibres musculaires, celle-ci est intense mais passagère. La douleur provient de l'arrêt de la circulation sanguine dans le muscle pendant cette contraction anormale [114].

1.2.4.3. Les antispasmodiques

C'est une substance utilisée pour atténuer ou supprimer un spasme. Ce sont des sédatifs et dans certains cas, des déprimeurs du système nerveux central [116].

CHAPITRE 2
MATERIEL ET METHODES

Partie 2.1

MATÉRIEL D'ETUDES

2.1.1. Matériel végétal

La plante *Melissa officinalis* L. a été récoltée au niveau de la station de Hammam Melouane, dans la forêt de *Chrèa* à 266 m d'altitude (Tableau 2.1). Elle a été identifiée au sein du *Parc National de Chrèa* (Direction de Blida). Cette identification a été confirmée au laboratoire de Biologie végétale du département d'Agronomie de l'université de Blida.

Les tiges feuillées ont été récoltées avant la floraison au mois de mai 2014. En juillet 2014, un autre prélèvement des fleurs a été effectué dans la même région.

Tableau 2.1: Coordonnées géographiques du site de récolte de *Melissa officinalis*

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude
Hammam Melouane	Blida - Algérie	266 m	36°28'46.06" Nord	3°02'51.05" Est

La plante a été séchée, à l'abri de la lumière et à la température ambiante (25 à 28°C). Après séchage, le matériel végétal est fractionné en deux parties : l'une est broyée pour obtenir une poudre fine, qui servira à la préparation des extraits, l'autre pour l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau.

2.1.2. Matériel bactériologique

Les bactéries utilisées sont des bactéries identifiées et référencées par le laboratoire de stérilité et microbiologie (Complexe Antibiotical SAIDAL), et par le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

Le matériel utilisé pour l'extraction, la purification et le test antibactérien est porté en appendice B.

2.1.3. Matériel animal

Les souris utilisées pour les tests pharmacologiques sont fournies par le laboratoire de pharmacotoxicologie, unité animalerie du Complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa.

Souris : *Mus musculus*, variété Albinos

Souche : NMRI

Poids : de 18 à 24g

Sexe : mâle

Nombre de souris : 48

Nourriture : Granules d'origine ONBA, fournisseur « la production locale », Bouzareah.

Boisson : eau de manière *ad-libitum*

Conditions d'hébergement :

Température : 40°C

Humidité : 50%

Eclairage : 10 h

Les essais ont eu lieu dans les mêmes conditions normales d'une animalerie conventionnelle au niveau du Complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa.

2.1.4. Matériel non biologique (Voir appendice B).

Partie 2.2

METHODES D'EXPERIMENTATION

Notre étude expérimentale a été réalisée sur une période allant de l'année 2014 à 2017.

Les différentes extractions ont été réalisées au niveau du :

- ✓ Laboratoire de recherche de biotechnologies, environnement et santé ainsi que le laboratoire des projets de fin d'études (P.F.E.) du département de Biologie à l'université de Blida.
- ✓ Laboratoire de phytopharmacie du département d'agronomie à l'université de Blida.

Les analyses physicochimiques ont été faites dans :

- ✓ Le laboratoire de physicochimie du complexe Antibiotical « SAIDAL » à Médéa,
- ✓ Le Laboratoire central de recherche de la Police scientifique et technique d'Alger.

L'étude de l'activité antioxydante a été réalisée au niveau du laboratoire des projets de fin d'études (P.F.E.) du département de Biologie à l'université de Blida.

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

L'étude des effets pharmacologiques de la plante *Melissa officinalis* L. a été réalisée au laboratoire de toxicologie du complexe SAIDAL à Médéa.

2.2.1. Etude ethnobotanique

L'enquête que nous avons menée sur terrain s'est déroulée en deux phases :

- ✓ La première phase porte principalement sur des entretiens effectués avec des personnes spécialisées dans le domaine de la phytothérapie et médecine

traditionnelle (médecins phytothérapeutes et herboristes) (Appendice C), afin d'établir une fiche technique de la plante *Melissa officinalis* L. La fiche comporte :

- Nom vernaculaire
- Nom scientifique
- Famille de la plante
- Localisation de la plante
- Culture
- Parties utilisées
- Période de récolte.

✓ La deuxième phase concerne un sondage auprès d'un groupe de la population, représentant toutes les catégories sociales, suivant un questionnaire qui leur a été remis (Appendice C).

Ce sondage est effectué dans le but de recueillir des informations sur la plante mais aussi des informations sur les connaissances en phytothérapie de ce groupe et ses préférences entre un traitement médical et un traitement naturel.

Cette enquête a concerné un échantillonnage de 125 personnes questionnées aléatoirement, dans les Wilayas suivantes : Blida, Alger, Boumerdès, Tipaza, Médéa, Tizi-Ouzou et Bouira.

2.2.2. Etude macroscopique et microscopique

Le but de cette étape est de chercher d'éventuelles spécificités morphologique et anatomique de la plante. Nous nous appuyons sur :

2.2.2.1. Examen macroscopique de la plante

Nous avons cherché des spécificités caractéristiques de *Melissa officinalis* L. en observant les organes : tige, feuille et fleur.

2.2.2.2. Examen microscopique de la plante

L'étude microscopique a porté sur la réalisation des coupes histologiques au niveau de la tige, feuille et pétiole avec une double coloration.

2.2.2.2.1. Coupes histologiques par microtome

La technique nécessite trois étapes fondamentales en se basant sur le passage des organes dans plusieurs bains successif (Figure 2.1). Le protocole est présenté en annexe (appendice D) [117]:

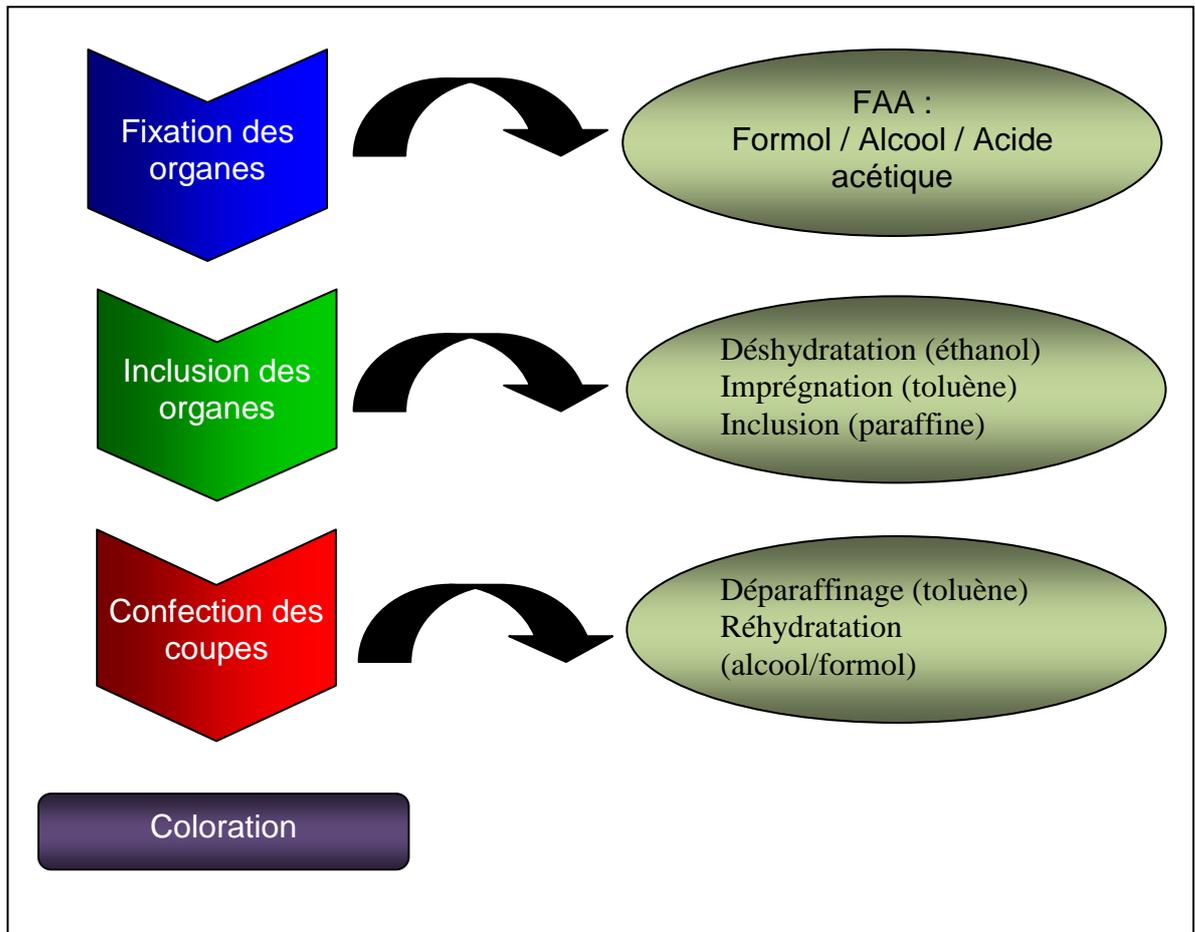


Figure 2.1 : Schémas résumant les principales étapes de réalisation des coupes histologiques par le microtome

2.2.2.2.2. Coupes histologiques à main levée

La technique universelle de la double coloration (Figure 2.2) a été réalisée selon les étapes suivantes :

- les coupes sont plongées dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules de leur contenu ;

- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min ;
- Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min ;
- Les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 5 à 10 min puis nous les plongeons dans le rouge Congo 15-20 min ;
- Les coupes sont ensuite lavées à l'eau, montées entre lame et lamelle et observées au microscope photonique.

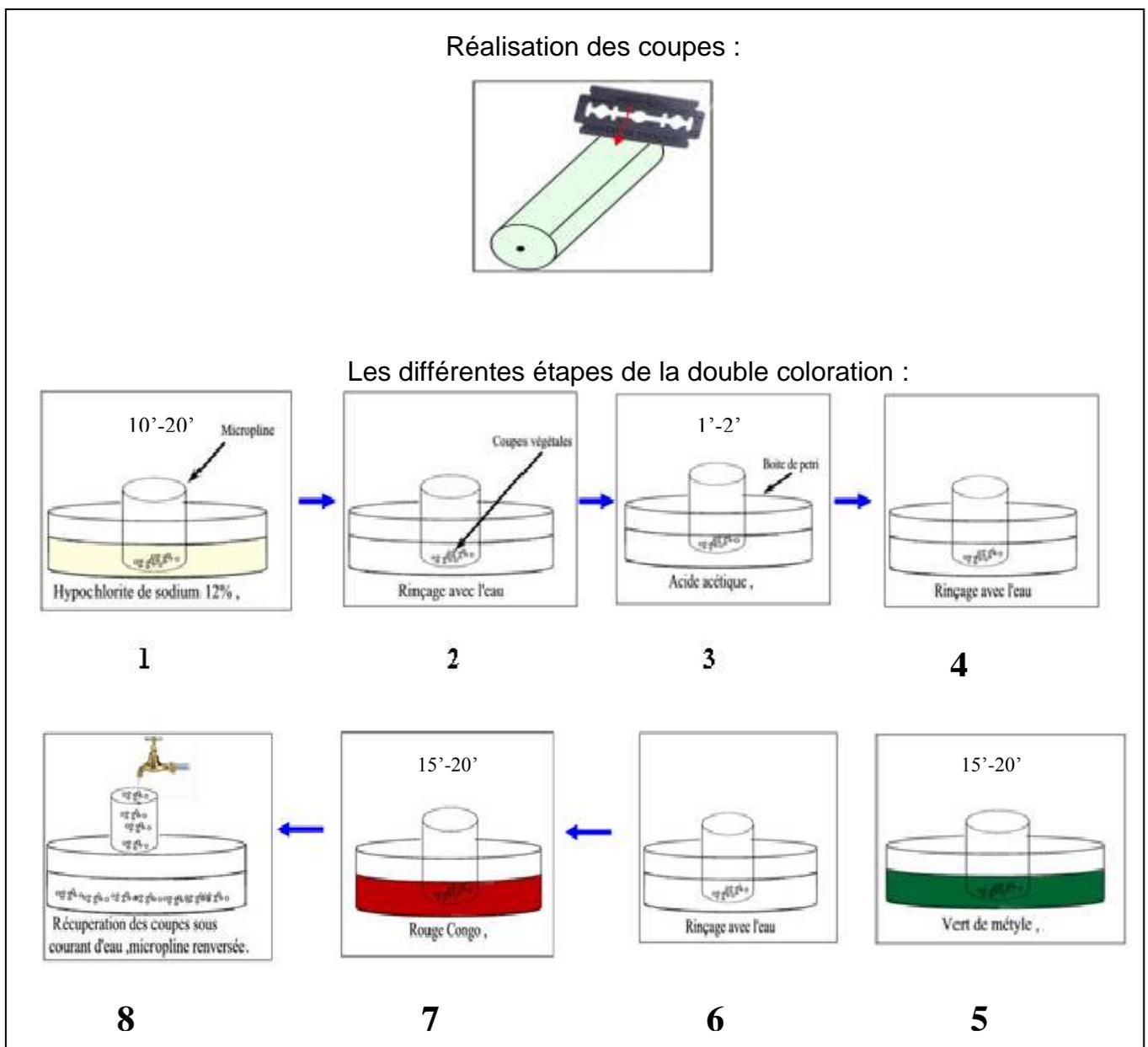


Figure 2.2 : Technique de la double coloration

2.2.3. Etude phytochimique

Le but de cette étude est de :

- Caractériser certains métabolites secondaires de la plante par screening chimique ;
- Déterminer la teneur en tanins et flavonoïdes ;
- Extraction et analyse des fractions polaire et apolaire par soxhlet ;
- Extraction et contrôle analytique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L.

2.2.3.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de réactions chimiques simples, permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques [118].

Le screening phytochimique a été effectué selon la méthode décrite Par BRUNETON [53].

- Principe :

Les tests phytochimique consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Le but de ces tests est de mettre en évidence la présence ou l'absence des principaux métabolites secondaires (anthocyanes, tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, glucosides, quinones).

Les tests sont effectués soit sur la poudre, soit sur un l'infusé.

Les résultats seront classés selon [119]:

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction moyennement positive : + +
- Réaction faiblement positive : +
- Réaction difficile à interpréter : ±
- Réaction négative : -

- Préparation de l'infusé :

Nous avons pris 10 g de poudre que nous avons mis dans 100 ml d'eau distillée en ébullition puis la solution est mise dans un agitateur magnétique pendant 15min, ensuite, on filtre à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat est récupéré dans un flacon ombré et conservé à une basse température.

a) Recherche des alcaloïdes

On fait humecter 5 g de poudre végétale avec 20 ml d'ammoniaque (NH₄OH 1M), qu'on laisse macérer pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange éther/chloroforme (3v/1v), le filtrat est épuisé par de l'acide chlorhydrique (HCl 2N).

A 1 ml du filtrat, on ajoute quelques gouttes du réactif de Dragendroff, l'apparition d'un précipité rouge, indique la présence d'alcaloïdes [120].

b) Recherche des substances polyphénoliques

b1/ Recherche des anthocyanes

Leur identification consiste à rajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl 0,1N) à 5ml d'infusé. La réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.

b2/ Recherche des tanins

On ajoute à 5 ml d'infusé quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ à 5%. La réaction donne une coloration bleu-noirâtre en présence des tanins [121].

- Tanins catéchiques

On ajoute 7 ml de réactif de Stiasny (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5) à 15 ml d'infusé. Ce mélange est chauffé au bain-Marie à 90°C pendant 15 min. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

- Tanins gallique

On ajoute 2g d'acétate de sodium à 5 ml d'infusé. On y ajoute quelques gouttes de FeCl₃ (1%). La réaction donne une coloration bleue foncé en présence des tanins galliques.

b3/ Recherche des flavonoïdes

On introduit dans un tube à essai 5 ml d'infusé, auquel on ajoute 5 ml d'acide Chlorhydrique (HCl), 1ml d'alcool iso-amylque, puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge-orangée indique la présence des flavonoïdes.

c) Recherche des quinones libres

A 2 grammes de poudre végétale humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique N (HCL N), on ajoute 20 ml de chloroforme, on laisse pendant 3 heures en contact, puis ce mélange est filtré. On introduit le filtrat dans un tube à essai et on lui ajoute 5ml d'ammoniaque (NH₄OH 1M). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

d) Recherche des saponosides

A 2 millilitres d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'une solution saturée d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc, indique la présence des saponosides [122].

e) Recherche des glucosides

A 2 grammes de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique (H₂SO₄ 1M). La formation d'une coloration rouge brique, ensuite violette indique la présence des glucosides [122].

2.2.3.2. Extraction des tanins et flavonoïdes

2.2.3.2.1. Extraction et détermination de la teneur en tanins

a- Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des tanins est le suivant :

30 g de poudre végétale sont dégraissées en les laissant macérer dans 100 ml d'éther de pétrole pendant 24 h. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés.

Le marc récupéré est repris par 50 ml d'éther diéthylique ensuite il sera filtré pour éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique.

Le marc est repris une deuxième fois par 100 ml de méthanol. Il est filtré dans un ballon préalablement pesé.

Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous vide pour obtenir un résidu sec. C'est un extrait pur de tanins qui sera pesé [53].

b- Détermination quantitative

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

Le calcul du poids des résidus de tanins, ainsi que l'évaluation de la teneur sont réalisés selon les formules suivantes:

$$M_t = P_2 - P_1$$

$$T_t = (M_t / M_v) \times 100$$

Avec :

M_t : masse de l'extrait sec des tanins en g.

M_v : masse de poudre végétale à extraire en g.

P_1 : poids du ballon vide en g.

P_2 : poids du ballon avec l'extrait sec des tanins en g.

T_t : teneur de la drogue en tanins en % / g de poids sec.

2.2.3.2.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes

a- Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des flavonoïdes est celui décrit par Guignard [123, 53].

* Macération:

Une quantité de 30 g de poudre végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 72 h. Après filtration, le méthanol est évaporé par un évaporateur rotatif à une température de 60°C sous vide. Le résidu sec obtenu est traité par 50 ml d'eau tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

* Extraction liquide-liquide:

Cette opération permet la séparation d'un ou de plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non miscibles.

Nous avons mis en œuvre une série d'extraction liquide-liquide dans des ampoules à décanter par des solvants non miscibles à l'extrait aqueux. Elle consiste en l'addition de 3x30 ml de chloroforme qui élimine la chlorophylle et les lipides. Ensuite, nous ajoutons 3x30 ml de l'éther diéthylique pour extraire les génines et les flavonoïdes libres. Enfin, l'addition de 3x30 ml d'acétate d'éthyle permet d'éliminer les monosides et entraîne la majorité des hétérosides flavoniques. Au cours de ces différentes étapes, nous récupérons la phase aqueuse.

Au cours de la dernière phase aqueuse, nous ajoutons 3x30 ml de butanol pour récupérer la phase alcoolique.

Cette dernière phase contenant les flavonoïdes est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Elle est ensuite soumise à une évaporation du butanol sous vide à 55 °C pour l'obtention du résidu sec. C'est l'extrait des flavonoïdes qui sera pesé.

b- Détermination quantitative

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

Le calcul du poids des résidus de flavonoïdes, ainsi l'évaluation de la teneur sont réalisés selon les formules suivantes:

$$M_f = P_2 - P_1$$

$$T_f = (M_f / M_v) \times 100$$

Avec :

M_f : masse de l'extrait sec des flavonoïdes en g.

M_v : masse de poudre végétale à extraire en g.

P_1 : poids du ballon vide en g.

P_2 : poids du ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes en g.

T_f : teneur de la drogue en flavonoïdes en % / g de poids sec.

2.2.3.3. Étude des composés non volatils polaires et apolaires

Le but de cette étape est d'extraire les fractions non volatiles polaires et apolaires par le soxhlet qui seront analysées par la suite pour révéler la présence de certains métabolites secondaires de *Melissa officinalis* L.

2.2.3.3.1. Extraction des composés non volatils

- Principe du Soxhlet :

L'extracteur de Soxhlet (Figure 2.3), est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition. Ensuite, il est condensé avec le condenseur, contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois [124].

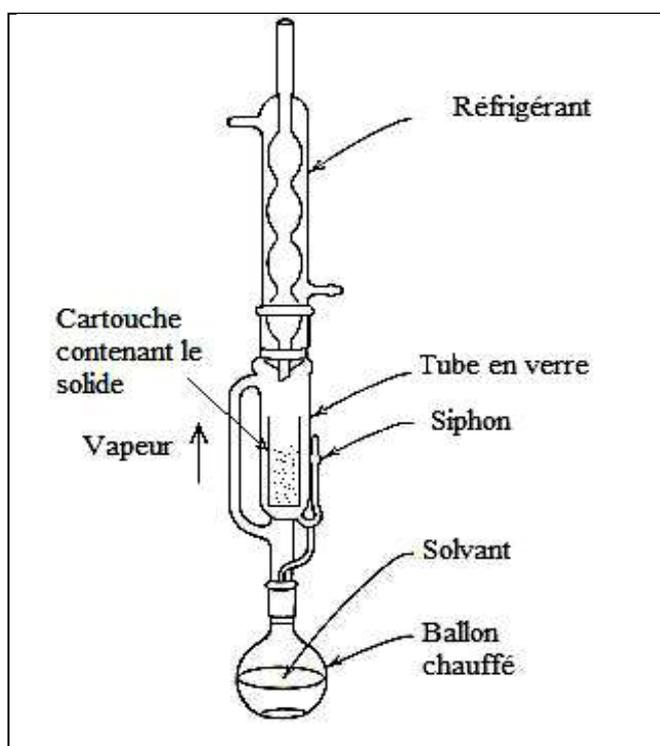


Figure 2.3. Schémas d'un extracteur de Soxhlet [125]

Le protocole expérimental est celui de FOUNEGEB et *al.* [126]. Il repose sur la technique d'extraction par solvants successifs. Il se fait en deux étapes :

- Mode opératoire :

Etape 1 :

La poudre végétale est dégraissée par un solvant apolaire. Les étapes sont :

- 40g de poudre végétale sont extraits par 500ml d'éther de pétrole à l'aide du Soxhlet ;
- Après 12 siphonages, le solvant récupéré est évaporé sous vide par l'évaporateur rotatif pour obtenir la concrète apolaire,
- La poudre végétale dégraissée est séchée à l'air libre pendant 24 heures.

Etape 2 :

Cette étape consiste à extraire les métabolites secondaires. Le mode opératoire est le suivant :

- La poudre dégraissée est extraite une deuxième fois par 500 ml de méthanol à 70% à l'aide du Soxhlet,
- Après 12 siphonages, la solution méthanolique est évaporée sous vide par l'évaporateur rotatif, pour obtenir la concrète polaire.

2.2.3.3.2. Analyse spectrophotométrique

- Principe de la spectrophotométrie ultraviolet- visible :

En faisant traverser par un faisceau lumineux monochromatique (lumière à longueur d'onde fixe et définie) une cuve contenant une solution, une partie de la lumière incidente va être absorbée par les molécules de la substance dissoute [127, 128].

L'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800nm, correspond à l'ultra violet (190-400nm) et au visible (400-800nm) [129].

Les concrètes apolaires et polaires des feuilles de la mélisse vont être analysées par spectrophotométrie ultraviolet- visible. Pour cette analyse, nous

avons préparé des solutions de 1mg /1ml d'éther pour les concrètes apolaires. Des solutions de même concentration ont été préparées dans du méthanol pour les concrètes polaires. Le but de cette analyse est de déterminer quelques groupements fonctionnels des concrètes de la plante.

2.2.3.4. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles

2.2.3.4.1. Extraction et détermination du rendement en huile essentielle

L'huile essentielle est extraite par entraînement à la vapeur d'eau, afin d'en obtenir un maximum.

- Principe de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Le but est d'entraîner avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée en essence de la matière végétale distillée, se condense dans le condensateur avant d'être récupérée dans une ampoule à décanter. On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits [130]. Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile.

- Mode opératoire :

- Nous préparons la matière végétale sèche puis on s'assure que toutes les parties du dispositif sont reliées les unes aux autres.
- Nous remplissons le ballon avec 500g de matière végétale sèche (tiges et feuilles).
- Remplir l'Erlen Meyer jusqu'à 4L et mettre sur une plaque chauffante. La vapeur commence à s'acheminer à travers le tube vers l'ampoule de sécurité puis vers le ballon où se trouve le végétal.
- La vapeur d'eau entraîne les constituants volatils dans le tube principal, pour ensuite une condensation dans le serpentin du réfrigérant rempli d'eau.

- Le distillat s'écoule goutte à goutte dans une burette. Ce distillat est constitué de deux phases mélangées, une phase huileuse qui est l'huile essentielle et une phase aqueuse.
- Ouvrir le robinet de la burette graduée pour récupérer l'hydrolat goutte à goutte dans un Erlen Meyer, l'HE reste dans la burette jusqu'à obtention de la quantité maximale de l'HE.
- L'huile essentielle est recueillie par simple décantation du distillat.
- La conservation de l'huile essentielle se fait à une température de 4°C dans un flacon en verre, à l'abri de la lumière.

- Rendement en HE :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter [131, 132].

Le rendement est exprimé en pourcentage, il est calculé comme suit:

$$R = (P_H / P_A) \times 100$$

Ou :

$$R = [\sum P_H / \sum P_A] \times 100$$

Avec :

R : rendement de l'HE en %.

P_H : poids de l'HE en g.

P_A : poids de la plante traitée en g.

2.2.3.4.2. Contrôle analytique de l'huile essentielle:

a- Contrôle organoleptique de l'HE

Les propriétés organoleptiques regroupent tout ce qui est perceptible par les sens.

Les différentes caractéristiques organoleptiques dont l'aspect, la couleur et l'odeur de l'HE ont été notées.

b- Analyse physico-chimiques de l'HE

Les constantes physico-chimiques de l'HE ont été déterminées selon des méthodes normalisées.

b1/ Indices physiques

❖ Indice de réfraction « AFNOR NFT 75.112.2000 »

L'huile essentielle polarise la lumière à droite et à gauche. Selon la norme AFNOR 2000, l'indice de réfraction est le rapport entre le sinus d'angle d'indice, et celui du rayon lumineux de longueur d'onde déterminée [132].

• Mode opératoire :

Le produit est placé à l'aide d'une pipette dans la cellule de mesure jusqu'au trait signalé. Après 15 secondes, temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé et à 20°C, refermer le couvercle, puis lire le résultat.

❖ Densité relative « AFNOR NFT 75.111.2000 »

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle, à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C [132].

• Mode opératoire :

- Laver et sécher un bêcher, puis le peser à l'aide d'une balance de précision à 0,0001 g près, pour déterminer son poids vide.

- Remplir le bêcher avec de l'eau distillée à 20°C (avec 1ml), et déterminer la masse apparente de son contenu en eau.

- Vider, laver et sécher le même bêcher, puis le remplir avec un volume d'huile essentielle (1ml), et déterminer la masse de son contenu en produit [132].

La densité est déterminée par la formule suivante :

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : est la masse en gramme de la fiole vide.

m_1 : est la masse en gramme de la fiole remplie d'eau.

m_2 : est la masse en gramme de la fiole remplie d'HE.

b2/ Indices chimiques

❖ Indice d'acide (IA) « NF ISO 1242 : 1982 »

- Principe :

L'indice (I_A) est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de substance.

- Mode opératoire :

Dissoudre une prise d'essai de l'huile essentielle dans 50 ml d'un mélange égal en alcool et en éther. Le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1 M, en présence de 0.5 ml d'une solution de phénolphtaléine. Après dissolution titrez par l'hydroxyde de potassium 0.1M. Le titrage est terminé par l'obtention d'une couleur rose qui persiste pendant au moins 15 secondes.

$$I_A = 5,61 \times V / m$$

V: Volume de KOH 0.1M consommé.

m : Masse de la substance à examiner.

❖ Indice de saponification « AN ISO 3637.1999 »

C'est l'ébullition à reflux d'un échantillon avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium par une solution titrée d'acide chlorhydrique (HCl) [133].

- Mode opératoire :

On pèse 1g d'HE et on lui ajoute 25ml de KOH alcoolique (0,5M). On adapte le réfrigérant et on chauffe à reflux pendant 60 mn, on ajoute à la solution chaude 1ml de la solution de phénolphtaléine et on titre avec l'HCl (0,5M) jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur.

On prépare un essai à blanc (essai témoin) dans les mêmes conditions opératoires.

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1) \times 56.1}{M}$$

Avec :

V_0 : volume (ml) de HCl utilisé pour essai à blanc

V_1 : volume (ml) de HCl utilisé pour la mesure de l'IS de l'échantillon

C : concentration (mole/l) du HCl

M : masse (g) de l'échantillon à analyser.

❖ Indice d'ester « AFNOR NFT 75.104.1994 »

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présente dans 1 g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification (I_s) et de l'indice d'acide (I_A).

$$IE = I_s - I_A$$

❖ Teneur en Eau

- Principe:

Pour doser de petites quantités d'eau, Karl Fischer en 1935, a proposé d'utiliser un réactif préparé par l'action du dioxyde de soufre sur une solution d'iode dans un mélange, de la pyridine et de méthanol anhydres. L'eau réagit avec ce réactif selon un processus en deux étapes, par lequel une molécule d'iode va disparaître pour chaque molécule d'eau présente dans la solution [134].

- Mode opératoire :

Mettre l'appareil en marche; vérifier si la solution de support de dosage n'est pas saturée; en suite neutraliser cette solution jusqu'à l'élimination totale des traces d'eau (c'est-à-dire jusqu'à ce que le voyant « on » de dosage s'allume).

Introduire 100 mg d'huile essentielle à l'intérieur du godet de dosage ; appuyer sur le bouton « on » du dosimat et le dosage de l'eau se fera automatiquement ; attendre la fin du dosage automatique, qui sera donné par l'allumage du voyant « on » en rouge. Noter le volume final du dosage indiqué dans le quadrant.

- Expression des résultats

La teneur en eau, est exprimée en pourcentage et calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau\%} = \frac{V_f \times F \times 100}{P}$$

F : Facteur de la solution de dosage Karl Fisher mg/ml d'eau (4.5429 mg/ml).

P : Pesée de l'échantillon (mg).

Vf : Volume final du dosage (ml).

c- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

- Principe :

Le but de cette analyse est la détermination de la composition qualitative des constituants de l'HE.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse soumis l'échantillon à plusieurs tests, à savoir:

- Ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température;
- Accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation;
- Détection et traitement du signal à la sortie de l'appareil ce qui conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse et charge m/z
- Identification par une comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs "banques de données" de référence [86, 87].

Les systèmes modernes sont généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés [91].

- Conditions opératoires :

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a été effectuée par un appareil de type Hewlett-Packard (6890N) couplé à un spectromètre de masse (HP 5973N) d'Agilent Technologies. La fragmentation est effectuée en mode électron-impact (E.I.) à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm). La température de la colonne est programmée de 70 à 250°C à raison de 4°C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1 ml.min⁻¹. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse et piloté par un logiciel « Turbomass » qui permettra l'identification des constituants aromatiques de l'huile essentielle. La composition en pourcentage a été calculée à partir de la somme des hauteurs de pic de la composition totale de l'huile.

2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

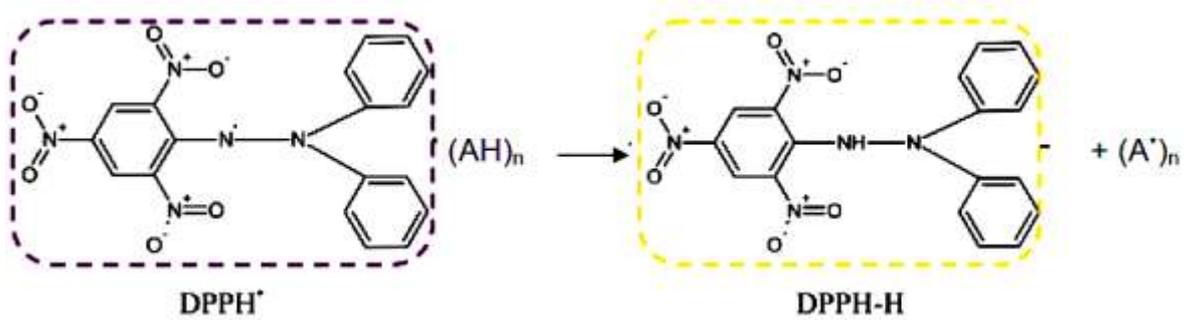
- ❖ Mesure de l'activité anti-radicalaire (DPPH) :

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par la méthode de piégeage du radical DPPH. Cette méthode est considérée comme étant très rapide, simple à mettre en œuvre, très sensible, très reproductible, ne nécessitant pas de matériels spécifiques.

Le pouvoir antioxydant des produits testés a été comparé à un antioxydant de synthèse « Butyl-hydroxy-toluène : BHT » et un antioxydant naturel « le tocophérol ».

- ❖ Principe :

La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH* (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) [135]. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



(AH)_n représente un composé antioxydant capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H de couleur jaune.

❖ Mode opératoire :

Le test utilisant le DPPH a été réalisé en suivant la méthode décrite par SANCHEZ-MORENO et *al.* [136, 137], où 50µl de chacune des dilutions des produits testés sont mélangés à 2ml d'une solution méthanolique de 60µM de DPPH (dissoudre 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol). Après une période de réaction de 30 minutes, à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 517nm.

L'activité antioxydante est donnée par le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH (A%) qui est calculé par la formule suivante :

$$A\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{blanc}}] \cdot 100$$

Où:

- A_{blanc} : Absorbance du témoin (DPPH) au temps zéro avant addition de l'échantillon à tester.
- $A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé.

Cette décoloration est représentative de la capacité des composés à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances [138].

Le paramètre IC₅₀ a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs. Il est défini comme étant la concentration de l'extrait efficace pour réduire 50 % de

DPPH en solution [138]. Cette grandeur est déterminée graphiquement en traçant pour un échantillon donné la courbe A% en fonction de la concentration puis on détermine la concentration qui correspond à A% = 50.

Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire à été calculé nommé « ARP » qui est égale à $1/IC_{50}$ [139].

❖ Analyse statistique :

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne de trois analyses \pm écart-type. L'analyse statistique a été exécutée en utilisant l'analyse de la variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives. Les régressions linéaires ont été obtenues en utilisant le logiciel (STATISTICA 8) et l'analyse statistique et l'importance de la corrélation entre les variables ont été exécutées en utilisant le logiciel (SigmaPlot 11.0).

2.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons testé l'effet de son HE et celui de la concrète polaire (extrait méthanolique). Ils sont comparés aux témoins positifs, en l'occurrence, un antibiotique « Ciprofloxacine » et un antifongique « Amphotéricine B ».

Le principe de cette étude consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact des principes et extraits de la plante.

❖ Principe :

L'évaluation du pouvoir anti-microbien est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé [140]. Dès l'application des disques imbibés par les substances actives à analyser, ces dernières diffusent

uniformément. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires, correspondant à une absence de culture [141].

❖ Mode opératoire :

Les souches microbiennes testées ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines, et sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection) référenciées par le laboratoire de stérilité du Complexe Antibiotical - SAIDAL et par le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Les souches microbiennes

Les souches		Références
Bactéries Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Bactéries Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433

Le protocole suivi est celui décrit par RAHAL [142]:

❖ Préparation des boîtes de culture :

On fait fondre, dans un bain Marie à 95°C, le milieu de culture approprié : Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud (SAB) pour la levure, ensuite on le verse aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 10ml/boîte, l'épaisseur du milieu doit être de 4mm [143].

On laisse solidifier les milieux de culture dans les boîtes de Pétri sur la paillasse, à température ambiante.

❖ Préparation de l'inoculum :

- Préparation des suspensions bactériennes : On prépare une suspension bactérienne (inoculum), à partir d'une jeune culture réactivée de 18 heures pour les bactéries. On réalise une suspension trouble pour chaque germe, en prélevant 3 à 5 colonies bien distinctes, à l'aide d'une anse de platine stérile, que l'on introduit dans 10ml d'eau physiologique stérile (0,9%), ensuite la suspension est bien homogénéisée au vortex. La densité optique de chaque suspension doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond environ à 108 UFC par ml pour les bactéries. Elle peut être ajustée en ajoutant des colonies bactériennes s'il est peu concentré, ou bien de l'eau physiologie stérile s'il est trop concentré. L'inoculum ainsi préparé doit êtreensemencé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

- Préparation de la suspension de levure: La levure estensemencée par la méthode des stries sur le milieu Sabouraud. Après 24 à 48 h d'une incubation à 25°C, 4 à 5 colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 10ml d'eau physiologique stérile (0,9%), la densité optique de la suspension fongique est mesurée au spectrophotomètre à 625nm (elle doit avoisiner 0,3).

❖ Ensemencement des boîtes :

On imbibe un écouvillon stérile avec la suspension trouble, et on l'ensemence en stries serrées sur la gélose en faisant pivoter la boîte de Pétri horizontalement à 60°, pour couvrir toute sa surface.

❖ Dépôt des disques :

Des disques stériles normalisés de 9 mm de diamètre sont imbibés avec 20µl de la substance à tester :

- L'huile essentielle.
- La concrètes polaire (solution de concentration de 1mg /1ml d'éthanol).

Nous avons utilisé aussi les disques de Ciprofloxacine (5 µg/disque) et Amphotéricine B (10 µg/disque).

Puis à l'aide d'une pince stérile, on les dépose soigneusement sur la surface de la géloseensemencée, au préalable, par la suspension microbienne (3 boîtes pour

chaque espèce microbienne). On doit également établir des repères pour reconnaître la correspondance de chaque disque.

❖ Incubation :

On laisse les disques diffuser sur la paillasse pendant 30 min, puis on transfère les boîtes pour incubation dans une étuve bactériologique, en les renversant sur leur couvercle (37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure).

❖ Lecture et expression des résultats:

Après écoulement du temps d'incubation requis, la sensibilité des souches testées est déterminée, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition développée autour du disque, à l'aide d'un pied à coulisse (exprimé en mm).

La zone d'inhibition est définie comme étant une auréole formée autour du disque, où aucune croissance n'est observée [144].

La mesure du diamètre des halos d'inhibition est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (Tableau 2.3).

Tableau 2.3: Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition [144]

Diamètres de la zone d'inhibition (Ø)	Transcription	Sensibilité du germe
Ø < 8 mm	-	Résistant ou non sensible
Ø compris entre 9 à 14 mm	+	Sensible
Ø compris entre 15 à 19 mm	++	Très sensible
Ø > 20 mm	+++	Extrêmement sensible

2.2.6. Etude de l'activité anti inflammatoire:

L'objectif de cette étude, consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'HE de la mélisse, dans un test discriminatoire pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

Ce test est très utilisé pour évaluer un nouvel anti-inflammatoire en première intention.

❖ Principe :

Le protocole adopté est celui décrit par BERKAN et *al.* [145]. Le principe du test consiste à provoquer un gonflement aigu de la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Elle se traduit par un œdème qui s'installe rapidement et persiste [146].

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de différentes doses de produits anti-inflammatoires à tester et du produit de référence.

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* à 0,1g/ml et 0,01g/ml sur l'œdème des pattes postérieures provoqué par l'injection d'une solution de carraghénine à 1% chez les souris.

Les carraghénanes ou carraghénine sont des polysaccharides linéaires sulfatés qui rentrent dans la composition de la paroi cellulaire des algues rouges.

❖ Mode opératoire :

Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire, les souris sont réparties en 4 lots de 6 souris chacun, dont 2 lots traités, un lot de référence et un lot témoin.

On a utilisé des souris albinos de souche NMRI, dont le poids est supérieur à 18g (de 18g à 24g de sexe mâle) et qui ont été privées d'alimentation la veille de l'expérimentation (une période de jeun approximativement de 18 heures).

1°/ Dans un premier temps, on procède à l'administration des différentes solutions à analyser par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (Appendice B3 - Figure1) « eau physiologique, HE de 0,1g/ml, HE de 0,01g/ml et Clofénal® 0,1g/ml » à la dose de 100mg/kg de poids corporel de chaque substance ou l'équivalent d'un volume de 0,5ml, réparti comme suit :

➤ Au temps T_0 :

- lot témoin : chaque souris reçoit 0,5ml d'eau physiologique.
- lot essai 1 : chaque souris reçoit 0,5ml de l'HE 0,1g/ml de la mélisse.
- lot essai 2 : chaque souris reçoit 0,5ml de l'HE 0,01g/ml de la mélisse.
- lot essai 3 : chaque souris reçoit 0,5ml du produit de référence (Clofénal®) à la même dose active.

2°/ Après 30 minutes de la prise de la dose indiquée, l'inflammation est provoquée en injectant un volume de 0,025ml d'une solution de carragénine 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de chaque souris (Appendice B3 - Figure 2).

La préparation de la solution de carragénine (1%) a été faite par une dilution de 20mg de la carragénine dans 2ml d'eau physiologique.

3°/ Quatre heures après l'induction de l'inflammation, l'activité anti-inflammatoire est évaluée en sacrifiant les souris par la rupture de la nuque. Ensuite, on leur coupe les pattes postérieures à hauteur de l'articulation pour les peser à l'aide d'une balance analytique. On procède aux calculs des moyennes arithmétiques des poids des pattes gauches et des pattes droites pour chaque lot.

❖ Expression des résultats

Les mesures effectuées serviront à la détermination de deux paramètres clés du processus inflammatoire qui sont :

- Le pourcentage d'augmentation de l'œdème (% AUG œdème) : pourcentage d'augmentation du volume de la patte postérieure gauche (PPG), enflée par rapport à la patte postérieure droite (PPD) saine de l'animal, qui est calculé comme suit :

$$\% \text{ AUG d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids des PPG} - \text{Moyenne des poids des PPD}}{\text{Moyenne des poids des PPD}} \times 100$$

- Le pourcentage de réduction de l'œdème (chez les souris traitées par rapport au témoin) selon la formule:

$$\% \text{ RED d'œdème} = \frac{\% \text{ AUG d'œdème témoin} - \% \text{ AUG d'œdème essai}}{\% \text{ AUG d'œdème témoin}} \times 100$$

❖ Etude statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne du diamètre des PPG \pm écart-type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test post-hoc de Student-Newman-Keuls pour comparaison par paires.

$P < 0.01$ a été considérée comme différence hautement significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SigmaPlot (Version 11.0).

2.2.7. Etude de l'activité antispasmodique

L'objectif de cette étude, consiste à évaluer l'activité antispasmodique de l'HE de la mélisse pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

❖ Principe :

Le test de contraction de Writhing [147] adopté dans notre étude, est une méthode chimique utilisée pour induire une douleur d'origine périphérique par injection de principes irritants chez la souris.

Une réaction douloureuse est provoquée chez les souris par injection intrapéritonéale d'acide acétique (CH_3COOH) à raison de 0,1/10g de poids corporel (Pc).

Les douleurs se manifestent par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes) qui peuvent être réduites par un produit antispasmodique [147].

L'activité antispasmodique du composé d'essai est déduite de la diminution de la fréquence des torsions.

Le test consiste à évaluer l'effet antispasmodique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* à deux concentrations différentes (0,1g/ml et 0,01g/ml) en comparaison à un produit de référence (contrôle positif) le phloroglucinol « Spasfon® ».

❖ Mode opératoire :

Afin de mettre en évidence l'effet antispasmodique, les souris (de 18g à 24g de sexe mâle) sont réparties en 4 lots de 6 souris chacun, et mises à jeun pendant 16 heures avant l'expérimentation.

1°/ Dans un premier temps, on procède à l'administration de 0,5 ml des différentes solutions à analyser par gavage comme suit:

- Le premier lot « témoin », reçoit de l'eau physiologique.
- Le 2ème lot reçoit le produit à tester " L'HE de la mélisse à 0,1g/ml ".
- Le 3ème lot reçoit le produit à tester " l'huile essentielle de la mélisse à 0,01g/ml ".
- Le 4ème c'est le lot contrôle positif, dont les reçoivent le phloroglucinol « Spasfon® 10mg/ml » dilué dans l'eau physiologique à 0,9% à une dose de 200mg/kg du poids corporel de l'animal.

2°/ Après 30 minutes, toutes les souris reçoivent 0,2 ml de la solution d'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale (Appendice B3 - Figure 3).

3°/ Après 5 minutes, le comptage du nombre de spasmes est observé directement sur les souris pendant 10min [148].

❖ Expression des résultats:

Le pourcentage de réduction des spasmes (pourcentage de protection) est calculé comme suit :

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{Moy. des spasmes du lot témoin} - \text{moy. des spasmes du lot traité}}{\text{Moy. des spasmes du lot témoin}} \times 100$$

❖ Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne du nombre de contractions abdominales \pm écart- type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test post-hoc de Student-Newman-Keuls pour comparaison par paires.

$P < 0.001$ a été considérée comme différence très hautement significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SigmaPlot (Version 11.0).

CHAPITRE 3
RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 3.1

RESULTATS DE L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE

3.1.1. Résultats de la première enquête

Après la première enquête, effectuée auprès des spécialistes en phytothérapie, nous avons obtenu des informations rassemblées dans le tableau en annexes (Appendice C).

Suite à nos différentes visites avec les médecins phytothérapeutes et les herboristes, nous avons établi la fiche technique suivante :

Nom vernaculaire français	La mélisse
Nom vernaculaire arabe	Trandjane
Nom vernaculaire local	Ferzizoua
Nom vernaculaire berbère	Ifer n'tzizoua
Nom vernaculaire anglais	Lemon balm
Nom scientifique	<i>Melissa officinalis</i> L.
Famille de la plante	Lamiacée
Localisation de la plante	Lieux incultes et ombragés
Culture	Plante spontanée et cultivée
Parties utilisées	Tiges et feuilles
Période de récolte	Avril, Mai

Ainsi, cette première enquête nous a permis de collecter les informations sur le nom vernaculaire de la mélisse, sa localisation, sa culture, ainsi que son utilisation en médecine traditionnelle.

3.1.2. Résultats de la deuxième enquête

L'enquête a concerné un échantillonnage de 125 personnes à travers sept (07) wilayas du Nord algérien (Figure 3.1).

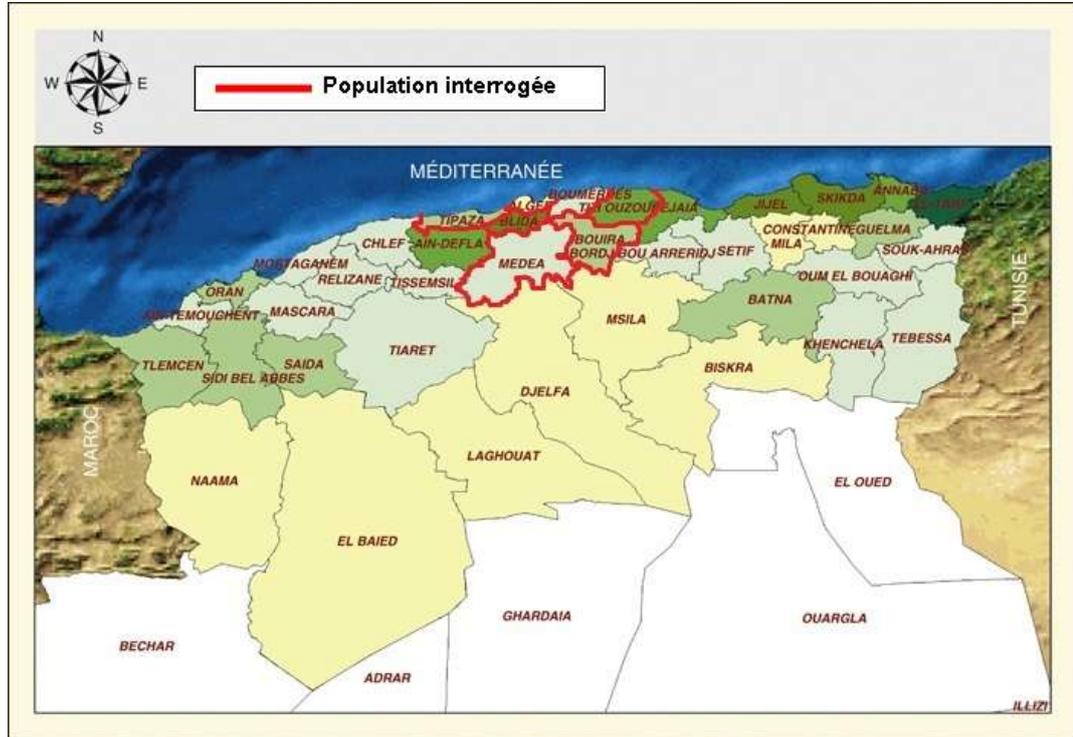


Figure 3.1 : Répartition géographique de la population interrogée

Cette enquête a abouti aux résultats illustrés par les figures de 3.2 à 3.10.

× Question n° 01 : Connaissez- vous la phytothérapie ?

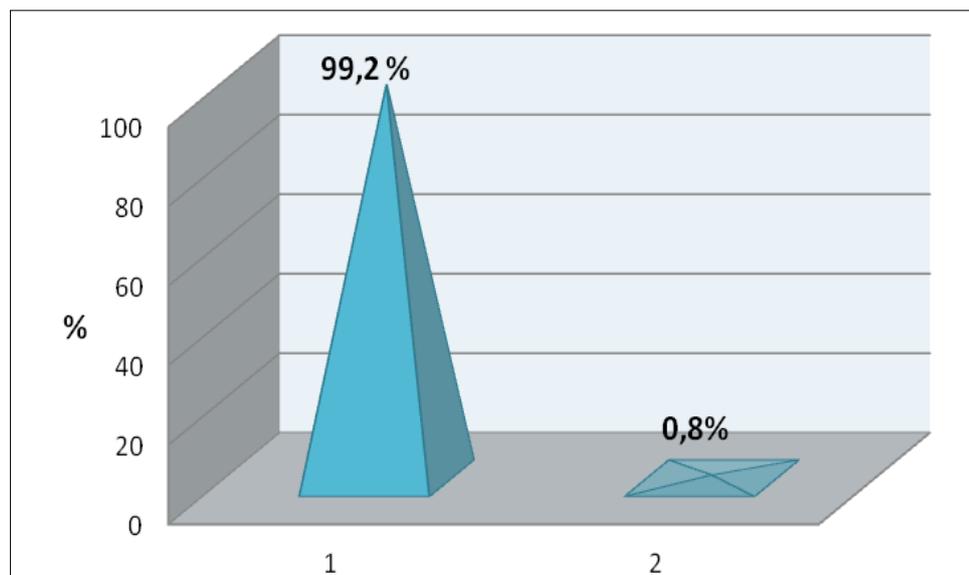


Figure 3.2 : Pourcentage des connaisseurs de la phytothérapie

Avec : 1 = Connaisseurs de la phytothérapie
2 = Non connaisseurs de la phytothérapie

Selon la figure 3.2, parmi les 125 personnes interrogées, 99,20% ont répondu par oui, et 0,80% par non. Donc la phytothérapie est majoritairement connue par cette catégorie de la population Algérienne.

Ce résultat nous confirme que ces dernières années, la phytothérapie est de plus en plus connue et prend une importante place parmi la population interrogée.

× Question n°02 : Comment la connaissez vous ?

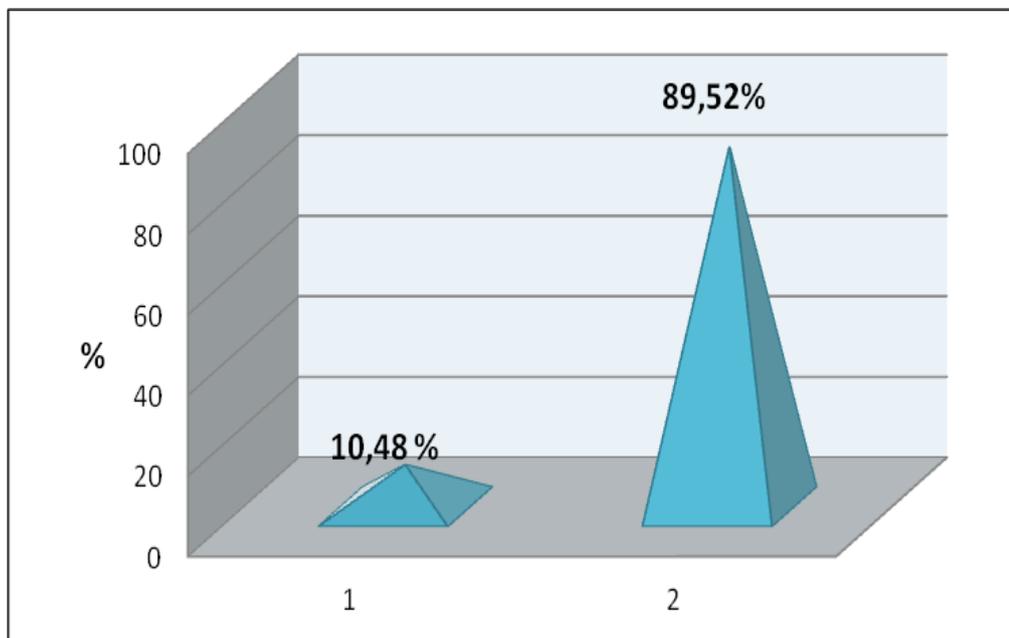


Figure 3.3 : Pourcentage des utilisateurs de la phytothérapie

Avec : 1 = Entendu parler de la phytothérapie
2 = Soigner par phytothérapie

D'après la figure 3.3, sur les 99,20% des personnes ayant dit oui, 10,48% ont entendu parler de la phytothérapie, mais ne l'ont jamais utilisée. Tandis que les 89,52% restant, utilisent les plantes médicinales pour se soigner.

Nous pouvons constater que beaucoup d'entre eux croient en la fiabilité de la phytothérapie comme un moyen de guérison comme une médecine alternative.

× Question n° 03 : Connaissez- vous la mélisse ?

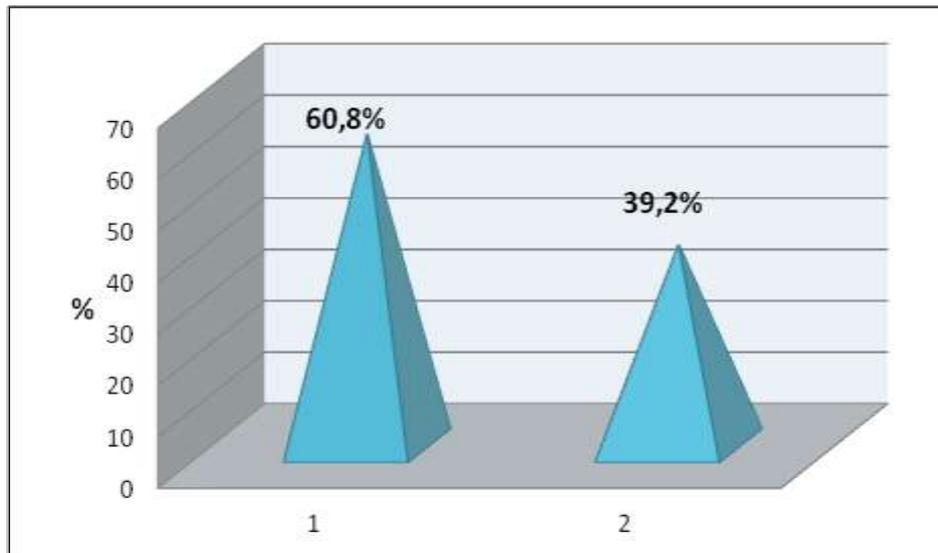


Figure 3.4 : Pourcentage des connaisseurs de la mélisse

Avec : 1 = Connaisseurs de la mélisse

2 = Non connaisseurs de la mélisse

A travers les réponses reçues (figure3.4), nous constatons que 60,80% du groupe connaissent la plante et 39,20% ne la connaissent pas.

× Question n° 04 : Comment la connaissez vous ?

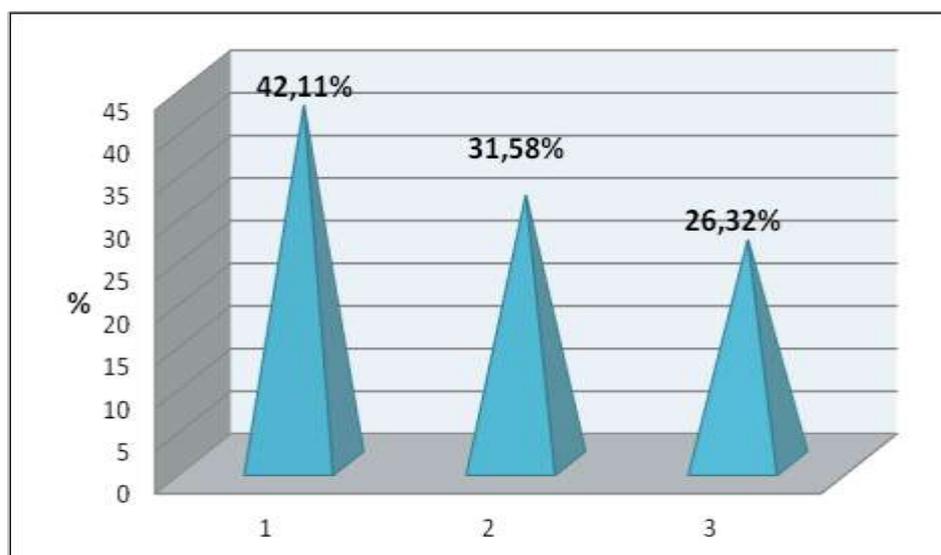


Figure 3.5: Pourcentage des sources de connaissances

Avec : 1 = Utilisée par une personne de l'entourage

2 = Utilisée par soi-même

3 = Entendu parler

Sur les 60,80% connaissant la mélisse :

- 42,11% la connaissent grâce à leur entourage,
- 31,58% connaissent la plante pour l'avoir utilisée personnellement,
- 26,32% des personnes ont en seulement entendu parler.

A l'issu de cette enquête et selon la figure 3.5, nous pouvons déduire que la majorité des personnes interrogées connaissent la mélisse, soit pour l'avoir utilisé, soit par leur entourage.

× Question n° 05 : Pour quelles maladies ou cas est- elle utilisée ?

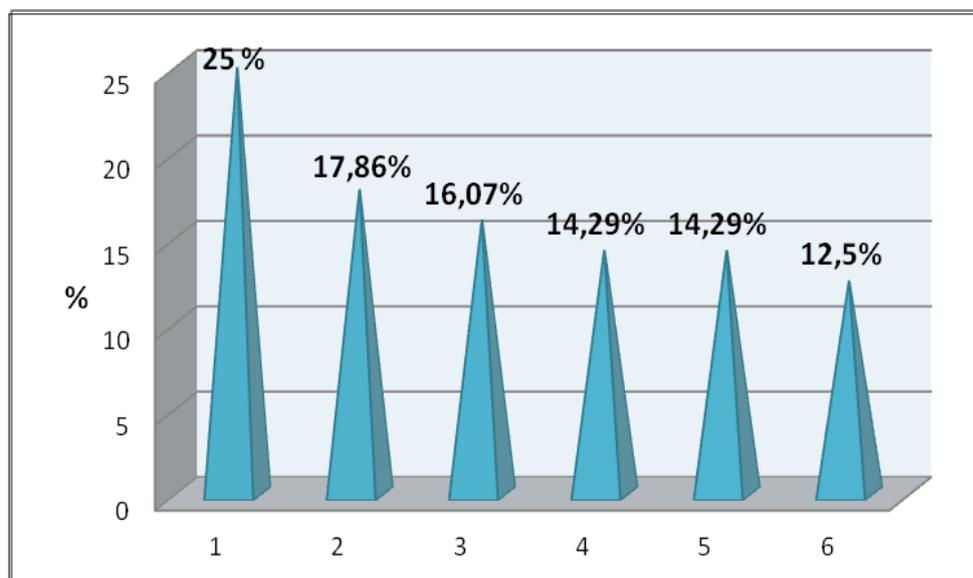


Figure 3.6 : Pourcentage des cas d'utilisations de la mélisse

Avec : 1 = Calmant

2 = Insomnies

3 = Etats grippaux

4 = Maladies de l'estomac

5 = Spasmes

6 = Autres cas

D'après les sondages et la figure 3.6, nous avons constaté que la mélisse est utilisée pour son effet calmant et contre les insomnies. Elle est aussi utilisée pour traiter la grippe, douleur d'estomac et les crises du colon. Ainsi nous avons constaté d'autre cas d'utilisation de la mélisse (notamment son utilisation contre les piqûres d'insectes, en apiculture et en cuisson au niveau des wilayas de Blida et Tizi-Ouzou).

× Question n° 06 : Quelle est la partie utilisée de la plante ?

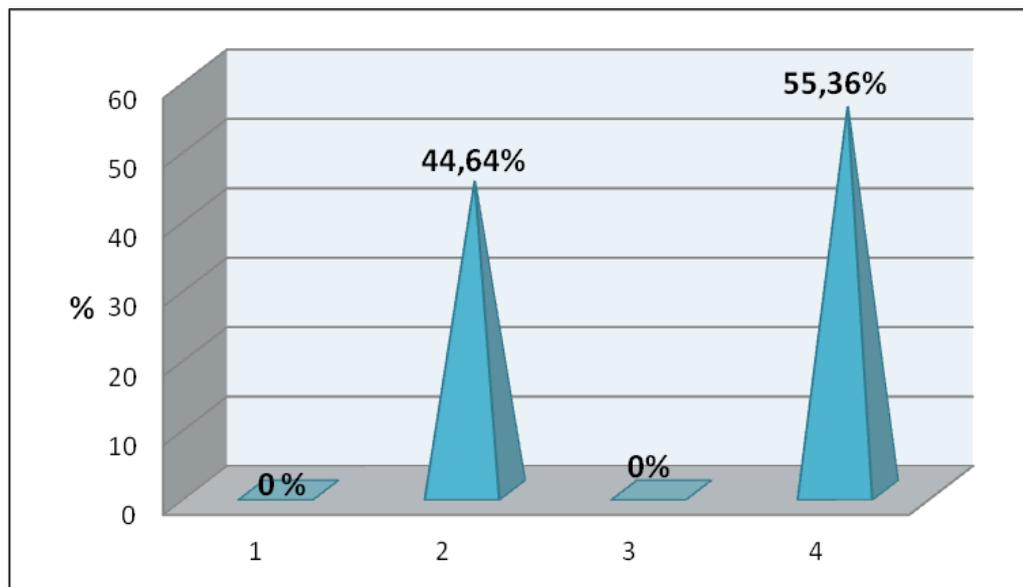


Figure 3.7 : Pourcentage des parties utilisées de la plante

Avec : 1 = Tige

2 = Feuilles

3 = Fleurs

2 = Tiges feuillées

D'après la figure 3.7, nous avons 55,36% de personnes ayant utilisé les tiges feuillées de la mélisse alors que 44,64% ont utilisé uniquement les feuilles. Ainsi, la plante entière est utilisée.

× Question n°07 : Son mode d'utilisation ?

D'après les réponses que nous avons recueillies auprès des personnes interrogées, nous pouvons dire que la mélisse est principalement utilisée en usage interne. Les personnes interrogées préparent des infusions, comme ils peuvent aussi utiliser la poudre des feuilles mélangée avec du miel.

× Question n° 08 : Le résultat est-il positif ?

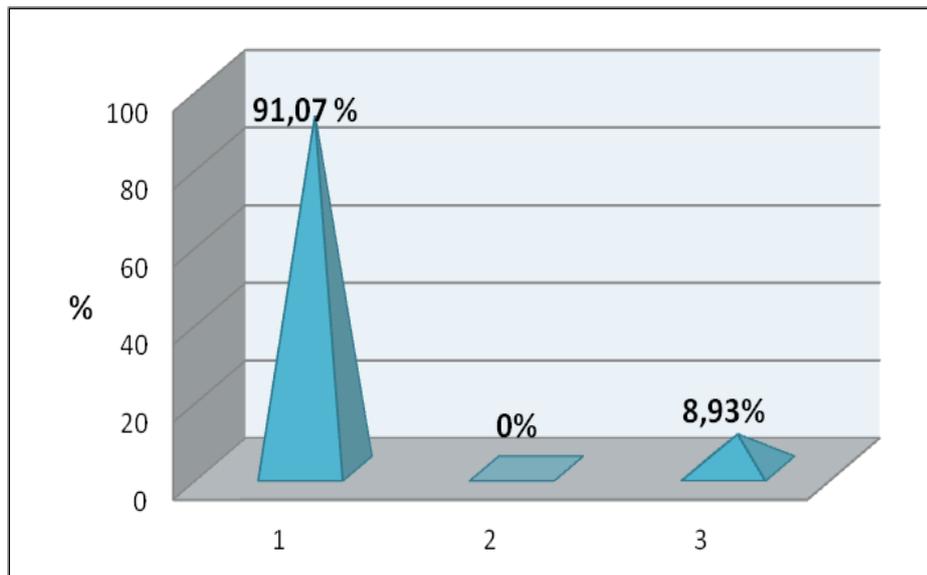


Figure 3.8 : Pourcentage des résultats d'utilisation de la mélisse

Avec : 1 = Résultat positif
 2 = Résultat négatif
 3 = Résultat inconnu

D'après la figure 3.8, nous constatons que 91,07% des personnes ont répondu oui, alors que 8,93% ignorent le résultat de cette utilisation.

× Question n° 09 : Y'a-t-il des effets secondaires ?

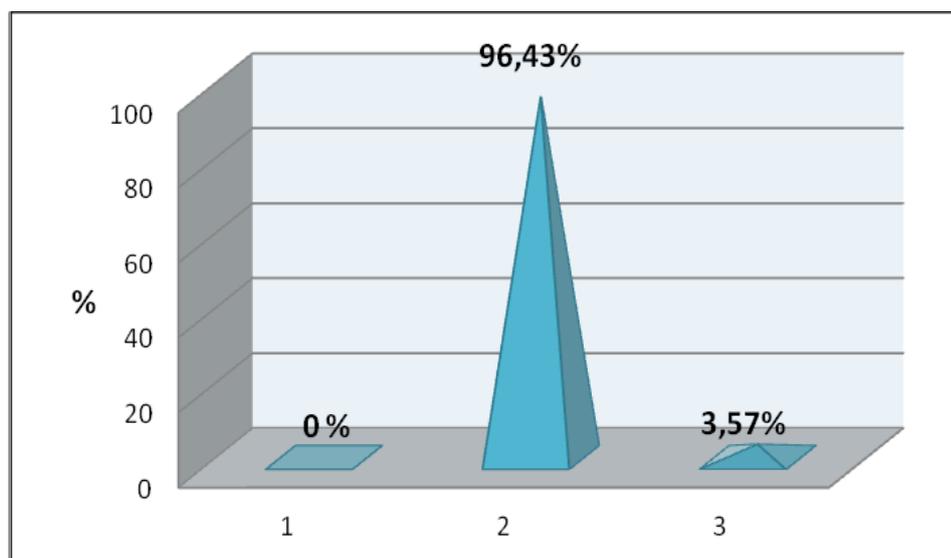


Figure 3.9 : Pourcentage des effets secondaires

Avec : 1 = Existe des effets secondaires
 2 = Pas d'effets secondaires
 3 = Ignore le résultat

D'après la figure 3.9, 3,57% des personnes interrogées ignorent si la mélisse a des effets secondaires ou pas, 96,43% n'en ont signalés aucun, par contre aucune personne n'a signalé des effets secondaires après son utilisation.

* Question n° 10 : Préférez-vous un traitement médical ou un traitement naturel ?

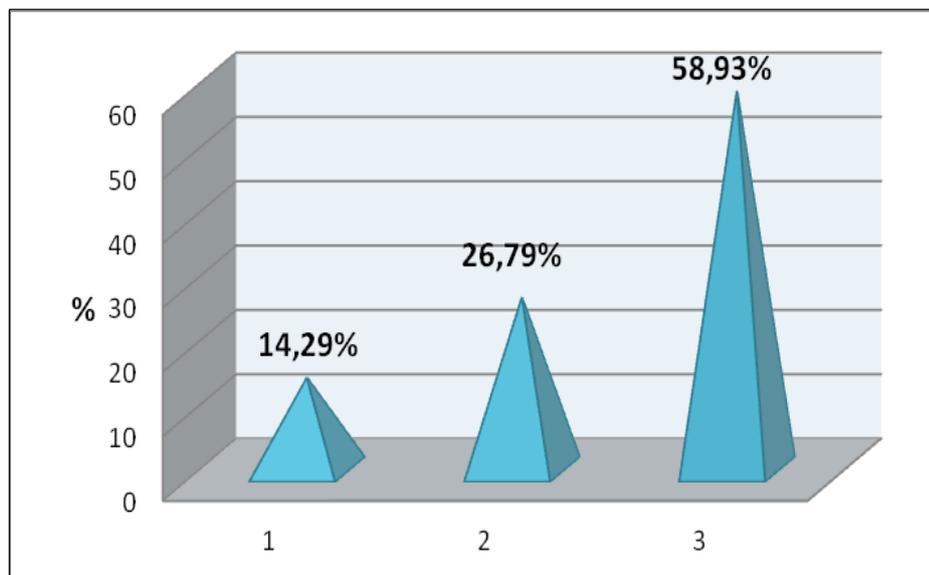


Figure 3.10 : Pourcentage des traitements adoptés par les personnes interrogées

Avec : 1 = Traitement naturel
 2 = Traitement médical
 3 = Les deux traitements

De la figure 3.10, il ressort que 58,93% préfèrent les deux traitements à égalité. Ainsi, 26,79% préfèrent un traitement médical alors que 14,29% optent pour un traitement naturel.

L'étude ethnobotanique a été une source importante pour la collecte des informations sur le degré de connaissance de la mélisse par les spécialistes, ainsi que son utilisation. Cette étude nous a permis également d'avoir une idée sur la place occupée par *Melissa officinalis* L. en phytothérapie en Algérie. En effet, nous avons pu constater que *Melissa officinalis* L. est plus utilisée dans les wilayas de Blida, Tizi-Ouzou et Bouira.

Partie 3.2

RESULTATS DE L'ETUDE MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE

3.2.1. Examen macroscopique de la plante

Après identification de la plante *Melissa officinalis* L. récoltée dans la région de Hammam Melouane, nous avons eu recours à quelques observations macroscopiques.

3.2.1.1. La tige

Elle est quadrangulaire et mesure 60 à 80 cm de longueur. Les observations à loupe binoculaire, ont montré que la tige est tapissée de poils épidermiques (Figure 3.11).

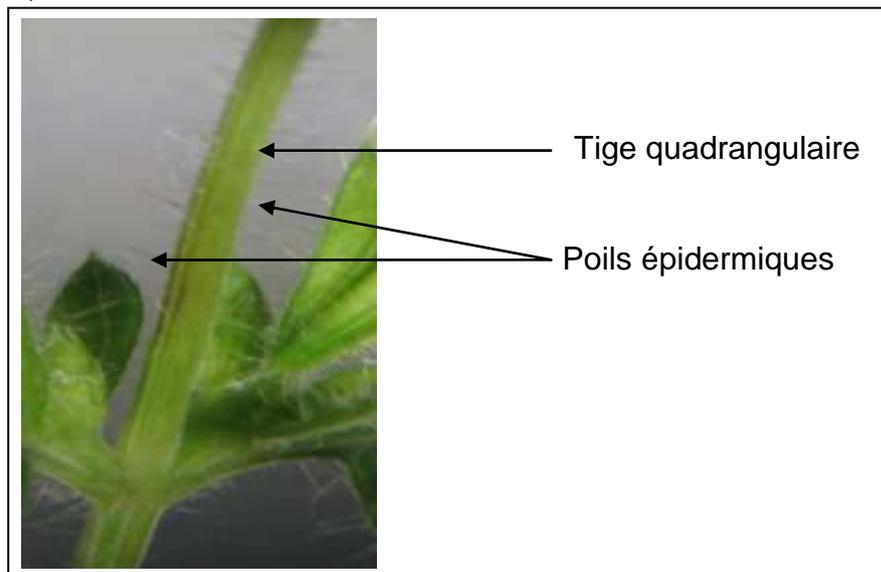


Figure 3.11: Observation d'une partie de la tige à la loupe Gx2.5 (originale)

3.2.1.2. La feuille

L'observation d'une feuille à la loupe binoculaire révèle que le limbe est ridé. Il est de couleur vert foncé sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure. La feuille est tapissée de poils épidermiques qui recouvrent les deux faces (Figure 3.12).

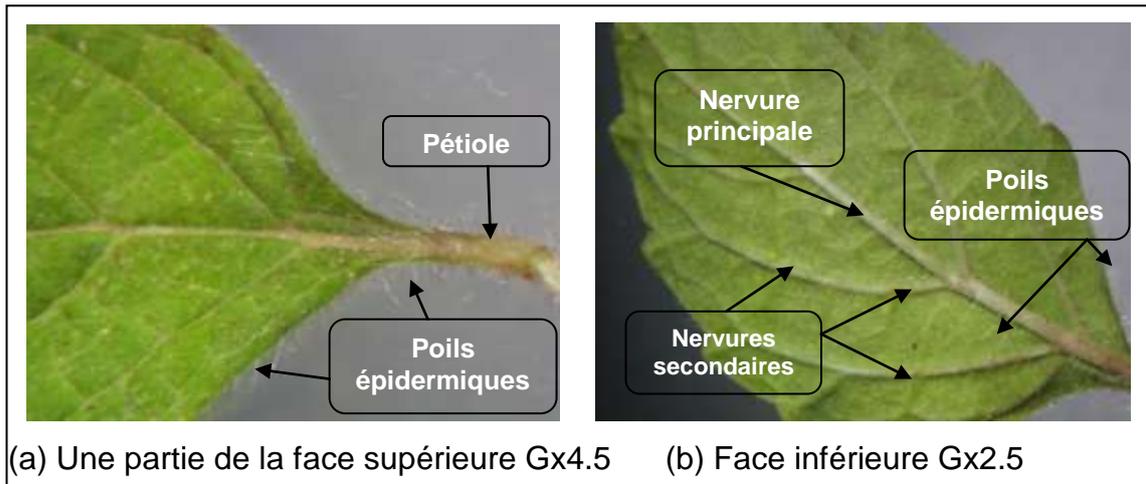


Figure 3.12: Observation de la feuille à la loupe binoculaire (originale)

3.2.1.3. La fleur

Elle est de petite taille. Elle est de couleur jaunâtre au stade bouton, puis blanche après l'épanouissement. Elle présente une corolle formée d'un tube et deux lèvres inégales (Figure 3.13).

Les étamines sont au nombre de 4. L'ovaire est supère et comprend 2 loges renfermant chacune 2 ovules (Figures 3.14 et 3.15).

Après maturation, le fruit contient 4 graines luisantes de couleur brunâtre à noir. La graine montre une écorce dure (Figure 3.16).

A la loupe binoculaire, la fleur présente des poils épidermiques au niveau du calice et de la corolle (Figures 3.13 et 3.14).

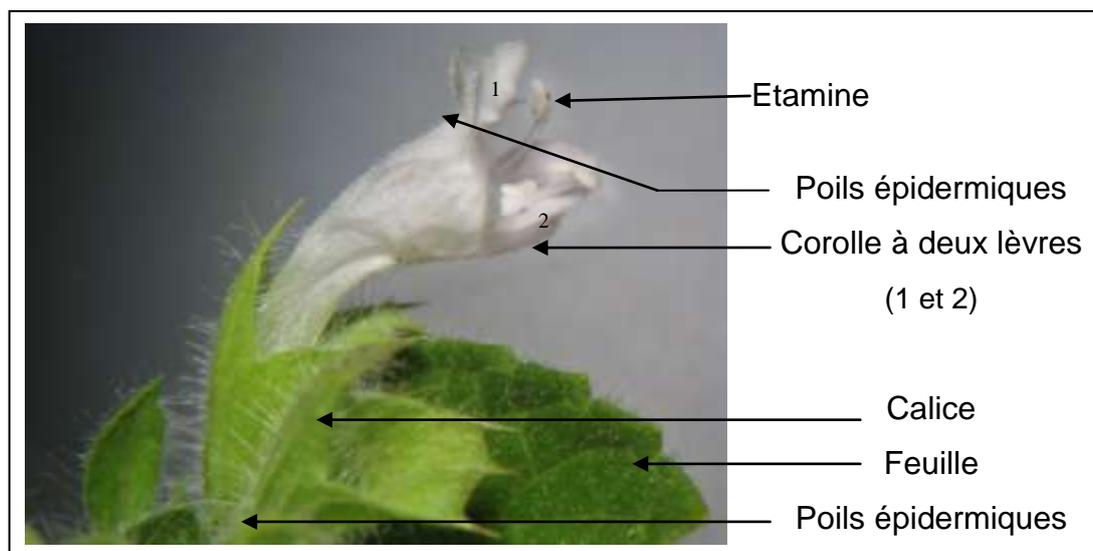


Figure 3.13: Observation de la fleur à la loupe binoculaire Gx4.5 (originale)

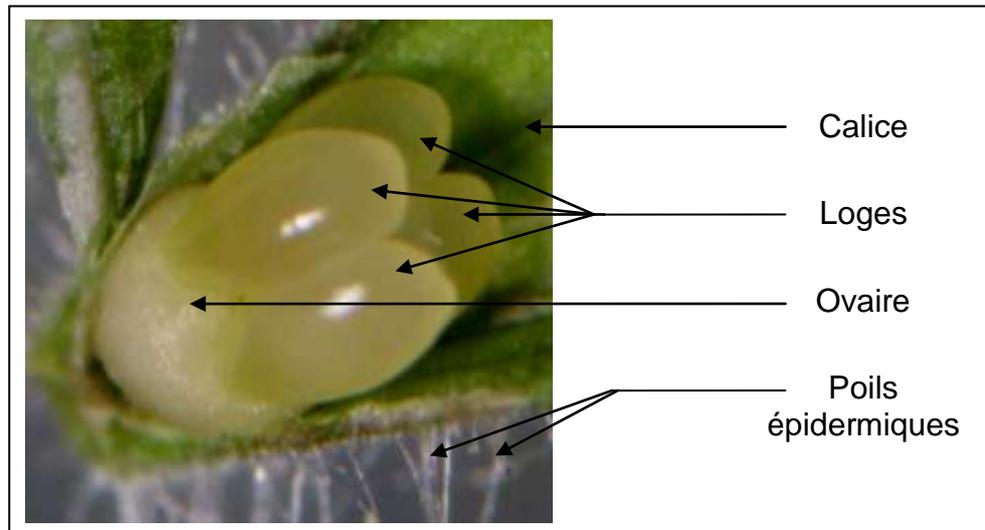


Figure 3.14: Observation de l'ovaire à la loupe binoculaire Gx4.5 (originale)

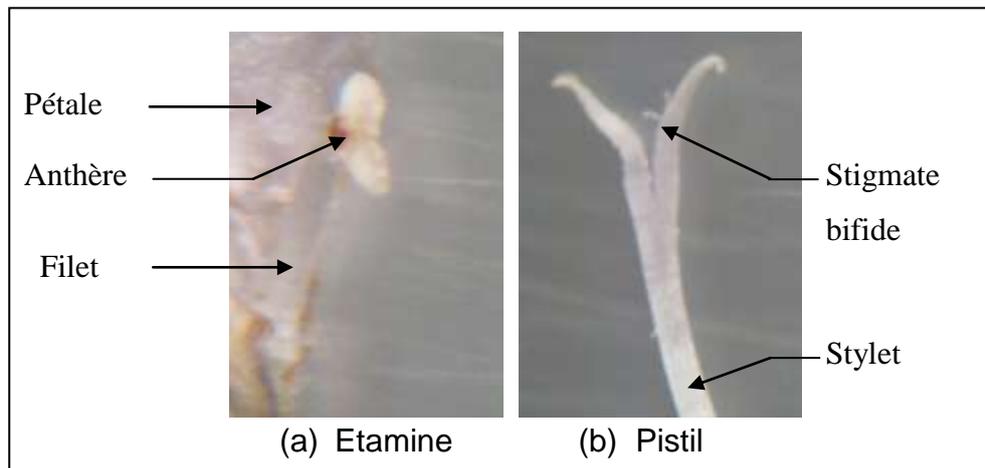


Figure 3.15: Observation des organes de la fleur à la loupe binoculaire Gx4.5 (originale)



Figure 3.16: Observation d'une graine à la loupe binoculaire Gx4.5 (originale).

3.2.2. Etude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices, nous avons effectué des coupes histologiques minces et colorées (à main levée et par microtome) dans les tiges, les feuilles ainsi que le pétiole.

3.2.2.1. La tige

Les Figures 3.17 et 3.18 illustrent des coupes transversales de la tige réalisées respectivement à l'aide d'un microtome et à main levée.

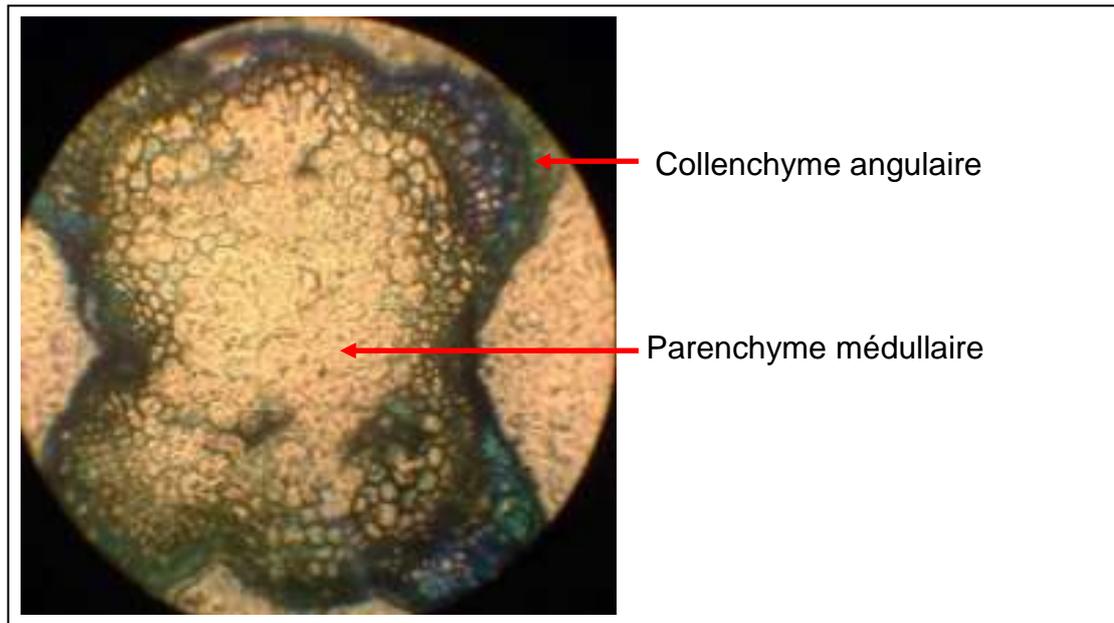


Figure 3.17: Coupe histologique de la tige de *M. officinalis* (Gx10) (Originale)

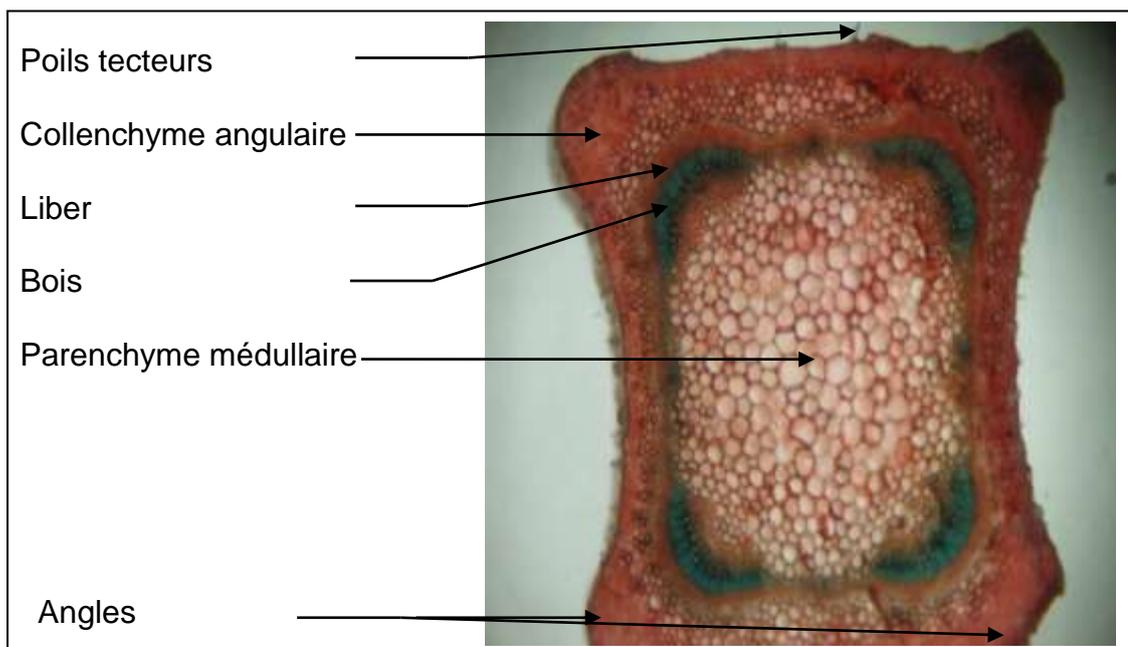


Figure 3.18: Coupe transversale au niveau de la tige de *M. officinalis* (Gx10) (Originale)

Selon les figures (3.17 et 3.18), nous avons observé au niveau des coupes histologiques de la tige de *Melissa officinalis* ce qui suit :

- La tige de la mélisse présente quatre angles. Les amas de collenchyme angulaire sous épidermique sont responsables de l'aspect quadrangulaire. Le collenchyme est un tissu vivant dont les parois cellulaires sont épaissies par la cellulose.
- Le sclérenchyme est un tissu mort dont la paroi des cellules est épaissies par une substance impénétrable : la lignine.
- Le liber est un tissu conducteur de la sève élaborée. Il est issu du méristème secondaire.
- Le bois est un tissu conducteur de la sève brute. Il est issu du méristème secondaire.
- Le parenchyme médullaire ou la moelle, formé par des cellules isodiamétriques amylières qui laissent des méats entre elles.

La structure histologique de la tige de la mélisse est une pachyte discontinue.

Les observations au microscope photonique montrent deux types de poils épidermiques, résultats de l'élongation de certaines cellules épidermiques. Ainsi, on observe des poils tecteurs constitués de plusieurs cellules, en l'occurrence pluricellulaires, et d'autres sécréteurs dont la tête est vésiculaire (Figure 3.19).

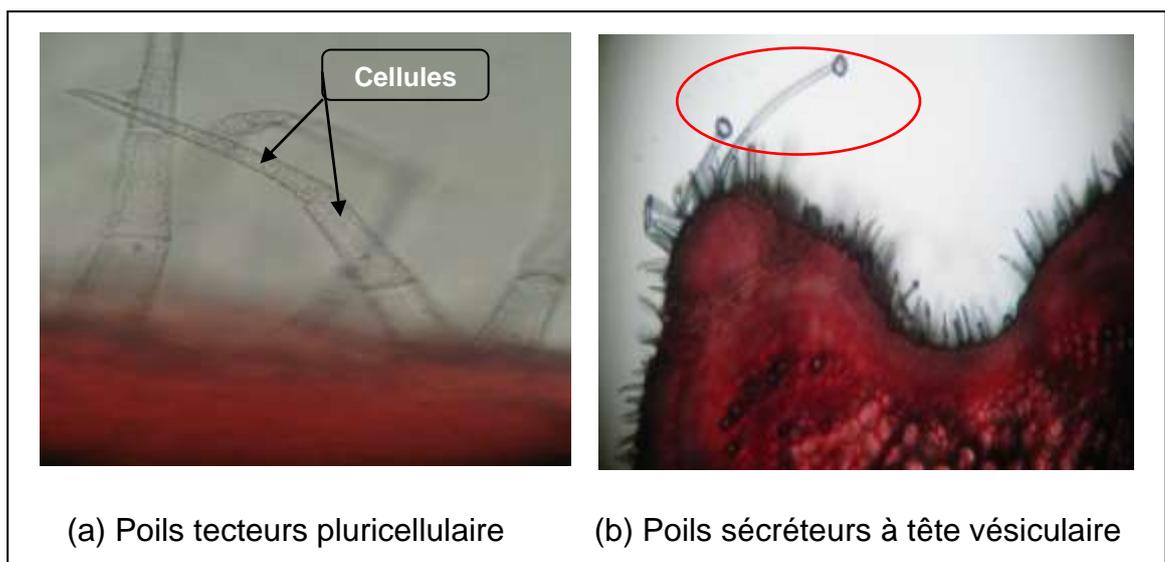


Figure 3.19 : Mise en évidence des poils épidermiques au niveau de la tige Gx40 (originale)

3.2.2.2. La feuille

La feuille de *Melissa officinalis* est recouverte entièrement par un épiderme : épiderme ventral et épiderme dorsal.

Les feuilles sont aussi tapissées de poils épidermiques.

Les observations au microscope photonique montrent les deux types de poils épidermiques en l'occurrence, tecteur pluricellulaires et sécréteur à tête vésiculaire (Figure 3.20).

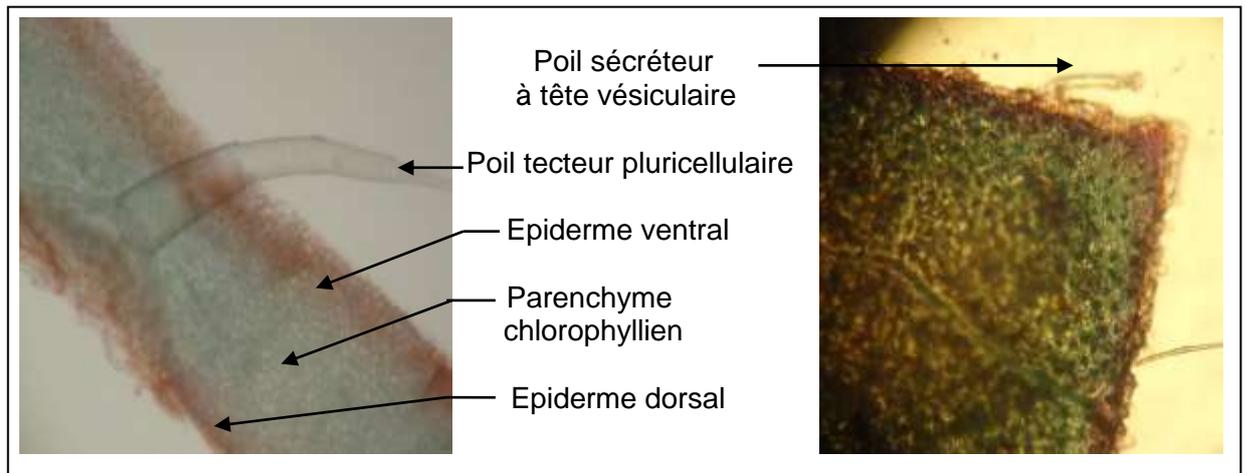


Figure 3.20: Observation des poils épidermiques au niveau de la feuille de *M. officinalis* Gx10 (originale)

3.2.2.3. Le pétiole

En coupe transversale de l'extérieur vers l'intérieur, le pétiole montre les structures anatomiques suivantes :

- ✓ Un épiderme : constitué par une assise de cellules dont certaines s'allongent vers l'extérieure pour donner des poils épidermiques. Sur cet épiderme on peut observer une cuticule.
- ✓ Un collenchyme dont les cellules présentent des épaisissements angulaires de nature cellulosique. C'est un tissu vivant.
- ✓ Un parenchyme cortical dont les cellules sont isodiamétriques.
- ✓ Les éléments conducteurs sont représentés par le bois et le liber (Figure 3.21).

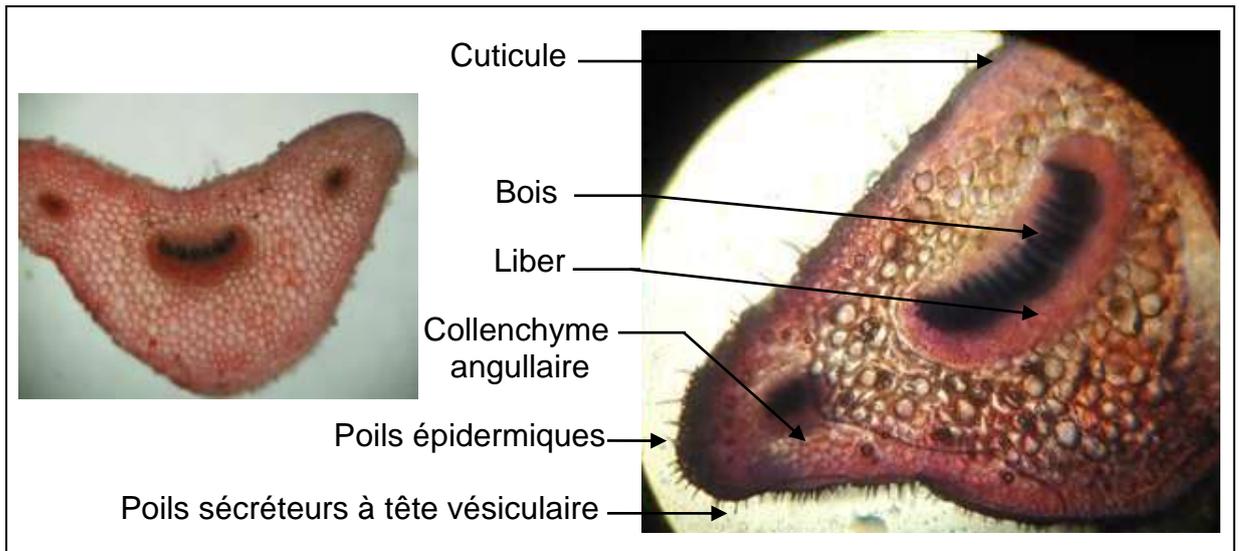


Figure 3.21: Coupe histologique au niveau du pétiole de *M. officinalis* Gx40 (originale)

L'aspect macroscopique de *Melissa officinalis* L. a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermiques sur la tige, les feuilles, le pétiole, le calice et la corolle. Ainsi, toute la plante est tapissée de poils épidermiques.

Les coupes histologiques réalisées dans les organes étudiés montrent la présence de poils sécréteurs à tête vésiculaire, seuls structure sécrétrice présente dans l'ensemble de la plante : *Melissa officinalis* L.

Toutefois, BOTTEGA et *al.* [149] et MARIN et *al.* [150] ont observé des trichomes glandulaires capités pouvant synthétiser et contenir l'huile essentielle chez les lamiacées.

On peut conclure que les poils épidermiques à tête vésiculaire sont seuls responsables de la sécrétion de l'HE de *Melissa officinalis* L.

Nos observations ne corroborent pas avec ceux obtenus par VAN-DEN-BERG et *al.* [151]. En effet nos résultats ne montrent pas la présence de trichomes glandulaires.

Partie 3.3

RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE

3.3.1. Résultats du screening phytochimique

La mise en évidence de différents métabolites secondaires de la plante, nous renseigne sur ses activités pharmacologiques.

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, et la coloration qui sont proportionnelles à la quantité de la substance recherchée.

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de la poudre et de l'extrait aqueux de *Melissa officinalis* L. par screening chimique sont regroupés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1:Le criblage phytochimique de *Melissa officinalis* L.

Métabolites secondaires		Résultat du teste
Anthocyanes		Absence -
Tanins	Tanins catéchiques	Présence ++
	Tanins galliques	Présence +++
Quinones libres		Absence -
Saponosides		Présence +++
Alcaloïdes		Traces +
Flavonoïdes		Présence ++
Glucosides		Absence -

Nous pouvons observer que les réactions du criblage phytochimiques effectués sur la poudre et l'extrait aqueux des feuilles de *Melissa officinalis* ont révélé leur richesse en composés phénoliques (les tanins galliques, tanins catéchiques, flavonoïdes) ainsi qu'en saponosides et la présence des alcaloïdes en l'état de trace.

Les tests de recherches des anthocyanes, des quinones libres et des glucosides se sont révélés négatifs.

En effet, l'étude complète du screening phytochimique met en évidence la présence des composés chimiques possédant des activités biologiques intéressantes, notamment les substances polyphénoliques (Tanins et Flavonoïdes).

Ces mêmes résultats ont été observés par BOUNIHI [152], qui a réalisé le screening phytochimique de la mélisse et la menthe récoltées au Maroc.

Les résultats obtenus à l'issue du criblage phytochimique sont appuyés aussi par ceux de NAGHIBI et *al.* [13], qui ont mentionné que les espèces des lamiacées sont riches en divers métabolites dont les flavonoïdes et les tanins.

3.3.2. Extraction de certains principes actifs de *Melissa officinalis* L

3.3.2.1. Résultats de l'extraction des tanins

L'analyse quantitative des tanins de la mélisse a été déterminée suite à la macération de la poudre des feuilles de la plante. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2: Résultats de la teneur en tanins

Prise d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Tanins (% / g du poids sec)
30	1,3600	4,5333

Le tableau 3.2. montre que *Melissa officinalis* est très riche en tanins, avec un taux de 4,53%, donnant à cette plante les différentes propriétés thérapeutiques [58].

Cette teneur correspond principalement à l'acide rosmarinique tel qu'il est précisé par ANTON [10] et TEUSCHER [4].

Selon PARIS et MOYSE [153], la mélisse séchée renferme 4% de tanins catéchiques.

3.3.2.2. Résultats de l'extraction des flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes de la mélisse a été déterminée par la macération de la poudre des feuilles de la plante suivie d'une série d'extraction liquide-liquide. Le tableau 3.3 montre le résultat de la teneur en flavonoïdes de la poudre de mélisse.

Tableau 3.3: Résultats de la teneur en flavonoïdes

Prisse d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Flavonoïdes (% / g du poids sec)
30	0,1300	0,4333

Nous constatons que *Melissa officinalis* contient 0,43% de flavonoïdes, conférant à cette plante des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et spasmolytiques appréciables [58, 53].

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par TEUSCHER [4]. En effet, selon TEUSCHER [4], la teneur en flavonoïdes est comprise entre 0,2 % et 0,7 % chez la mélisse.

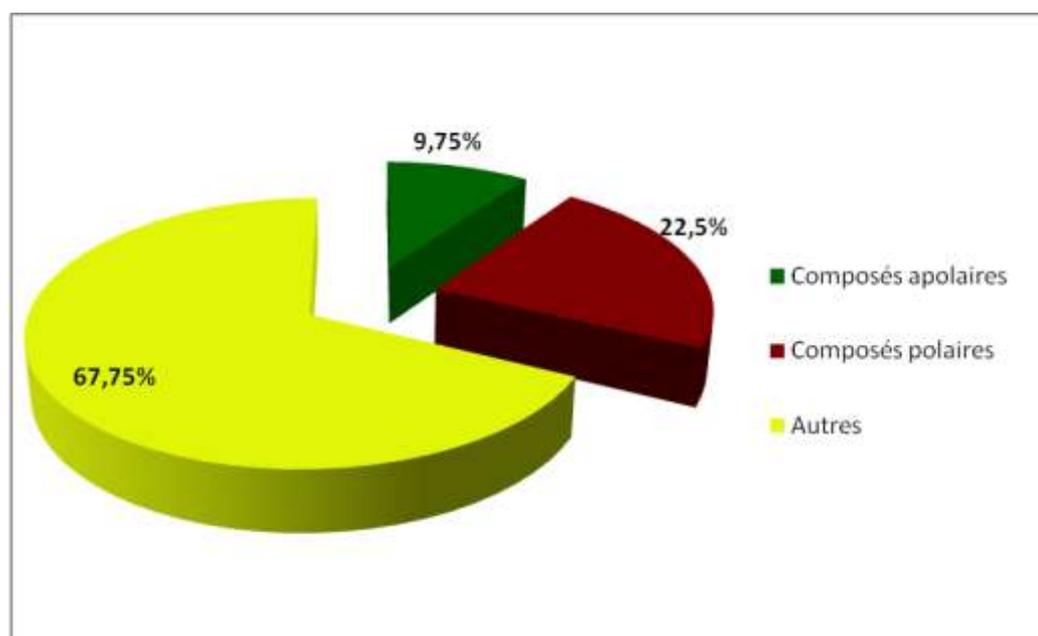
3.3.3. Étude des composés non volatiles apolaires et polaires

3.3.3.1. Résultat de l'extraction au soxhlet

L'extraction à l'aide du soxhlet, des composés apolaires et polaires de la poudre de mélisse a donné les résultats regroupés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires

	Poids de la concrète (moyenne en g)	Rendement en pourcentage (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
Composés apolaires « Extrait éthanolique »	3,90	9,75	Friable	Vert foncé
Composés polaires « Extrait méthanolique »	9	22,5	Collant pâteux	Marron foncé

Figure 3.22: Teneur en composés apolaires et polaires de *Melissa officinalis* L.

La figure 3.22, montre que la teneur en substances non volatiles est de 67,75% du poids de la poudre de la plante. Les composés apolaires représentent 9,75 % et les composés polaires représentent 22,5 % du poids de la poudre de la plante.

D'après ces résultats, la mélisse, à travers les différents solvants d'extraction polaire (méthanol) et apolaire (éther de pétrole), contient une proportion

importante en composés polaires, avec un coefficient de 2,31 par apport aux composés apolaires.

Les extraits méthanoliques sont quantitativement les plus importants. Ainsi, la poudre végétale utilisée (celles des feuilles) contient beaucoup de composés solubles dans le méthanol.

L'extrait méthanolique des feuilles est d'un aspect collant, pâteux de couleur marron très foncé, tandis que l'extrait éthanolique est poudreux et friable, de couleur vert foncé (Tableau 3.4).

3.3.3.2. Analyse des fractions par Spectrophotomètre UV-visible

L'analyse qualitative par balayage spectral des concrètes, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Type SHIMADZU UV-1601), a été effectuée sur des solutions homogènes, en dissolvant 1mg de chaque résidu sec dans 1ml de solvant approprié.

Le balayage a été effectué entre 220 nm et 800 nm afin de vérifier la présence de métabolites. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 3.23 et 3.24.

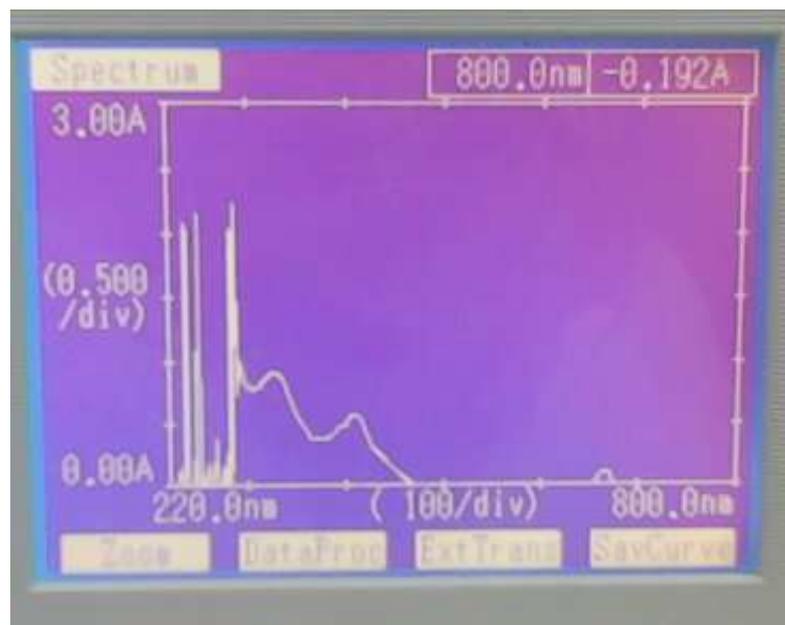


Figure 3.23 : Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de *Melissa officinalis* L. (originale)

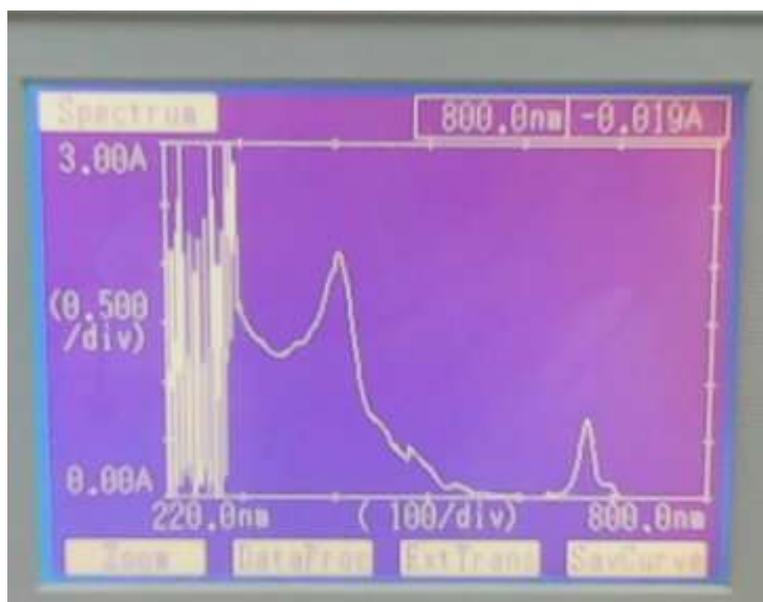


Figure 3.24: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L.
(originale)

Dans les figures 3.23 et 3.24 on observe les différents pics d'absorption en fonction de la longueur d'onde et de l'absorbance pour chaque fraction confirmant ainsi l'efficacité de l'extraction.

Selon LAFONT [154], le domaine d'absorption situé entre 291 nm et 300 nm est propre aux composés benzéniques, alors que le domaine entre 400 nm et 498nm est caractéristique aux caroténoïdes et dérivés.

Nous pouvons remarquer que le spectre de la fraction apolaire présente une absorbance élevée entre 280 nm et 420 nm. Cette absorption peut être expliquée par la présence de composés benzéniques. L'absorption à 300 nm est spécifique aux triglycérides insaturés. L'absorption à 402 nm et à 671 nm correspond respectivement à la richesse en caroténoïdes colorés en jaune orange et représenté par le β -carotène et en chlorophylle [154]. Ces résultats confirment d'autre part l'affinité du solvant « éther de pétrole » aux lipides et à la chlorophylle.

Selon MARKHAM [155], l'absorbance à 415 nm, correspond aux flavonoïdes. Cependant, l'extrait méthanolique provenant des feuilles de la mélisse, présente une absorbance importante dans ce domaine.

Les pics d'absorbance situés entre 247 et 339 nm, correspondent à des polyphénols de type flavonols [155]. L'extrait méthanolique présente des

domaines d'absorbance dans ce même intervalle, confirmant la présence de ce type de composés phénoliques. On remarque aussi la richesse en caroténoïdes.

Nous avons remarqué une faible absorption à 505 nm qui est spécifique aux dérivés hydroxycinnamiques exprimés en acide rosmarinique, selon la pharmacopée européenne [27].

Ainsi, nous pouvons remarquer à partir du spectre de la fraction polaire la présence de plusieurs molécules actives au niveau de cet extrait alcoolique.

L'analyse des deux concrètes de *Melissa officinalis*, révèle que la fraction polaire est très riche en métabolites secondaires ce qui lui confère différentes propriétés thérapeutiques.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montrés que les facteurs extrinsèque (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [156].

3.3.4. Etude des composés volatils de *Melissa officinalis* L.

3.3.4.1. Rendement en huile essentielle

L'huile essentielle extraite à partir des tiges feuillées de la plante séchée à été obtenue par le procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau. Le rendement en huile essentielle, exprimé par la quantité d'huile en ml obtenu pour cent gramme de matière végétale sèche de mélisse est représenté dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5: Résultats du rendement en HE

Poids de la plante (moyenne en g)	Poids de l'HE (moyenne en g ± écart type)	Rendement (% ± écart type)
1432,3767 ± 16,3760	2,8633 ± 0,0732	0,1999 ± 0,0031

Nous avons obtenu un rendement moyen de 0,20% en HE. Ce rendement appartient à l'intervalle décrit par plusieurs chercheurs. Ainsi, WICHTL et ANTON [10] et TEUSCHER et *al.* [4], ont rapporté que la teneur moyenne en HE des feuilles de mélisse est faible et varie de 0,05 à 0,3%. Alors que BABULKA [157] et GRUENWALD et *al.* [158], ont mentionné que cette teneur est très variable de 0,02 à 0,8%.

Ce rendement est inférieur à celui obtenu par ABDELLATIF et *al.* [159]. Ils ont obtenu un rendement de 0,34% par le procédé de l'hydrodistillation sur *Melissa officinalis* récoltée à la wilaya d'Alger.

Cependant, le rendement obtenu est plus important que celui obtenu par SADRAEI et *al.* [160], où l'hydrodistillation des plants de *Melissa officinalis* L. de la région de Kashan (Iran) a présenté un rendement moyen de 0,1%.

On peut constater que le rendement en HE peut varier d'une région à une autre, en relation avec les facteurs pédoclimatiques et selon l'équipement et le procédé d'extraction.

D'après SARI et CEYLAN [22], sur 11 populations de *Melissa officinalis* provenant de deux localités en Turquie, l'hydrodistillation des feuilles des plants a révélé une différence dans les rendements en huiles essentielles qui est de 0,03% pour la localité de Bozdag et de 0,067% pour la localité de Menemen.

En effet, ADZET et *al.* [161], MRLIANOVA et *al.* [162], MRLIANOVA et *al.* [163] et PATORA et *al.* [164], ont mis en exergue que les rendements en huiles essentielles peuvent varier d'une région à une autre, selon les facteurs pédoclimatiques (sol, pratiques culturales, climat), l'âge de la plante, la hauteur de la coupe, la période et l'endroit de récolte de la plante, les conditions de séchage, de stockage et particulièrement l'espèce elle-même.

Il a été aussi signalé que le stade phénologique avait une importance dans la production en HE. Ainsi, MRLIANOVA et *al.* [162] ont montré que le pourcentage d'huiles essentielles des feuilles, au stade avant de floraison, varie de 0,06 à 0,16%.

*caractéristiques organoleptiques :

Le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau nous a permis d'obtenir une HE dont les caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur) sont consignés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6: Caractéristiques organoleptiques de l'HE

HE de <i>Melissa officinalis</i>	
Aspect	Liquide
Couleur	Jaune foncée
Odeur	Très forte, citronnée et très agréable

Nous avons obtenu une huile essentielle liquide de couleur jaune avec une odeur très forte citronnée et très agréable.

Ces caractéristiques se rapprochent de ceux observées par certains chercheurs.

BARDEAU [165], rapporte que l'HE de la mélisse est incolore à faiblement jaunâtre dégageant une odeur très fine et agréable de citron.

Selon BAHTIYARCA BAGDAT et COSGE [11], l'HE de la mélisse est de couleur jaune pâle et elle est riche en composés terpéniques volatils qui lui confèrent une légère odeur citronnée.

FILHO et *al.* [166] et XING et *al.* [167], ont rapporté que le citral (ou lémonal) est un aldéhyde aliphatique à une forte odeur de citron. Il est présent sous forme de deux stéréo-isomères, le gèranial (trans) et le néral (cis). Le gèranial a une très forte odeur de citron alors que le néral a une odeur plus douce et ces composés sont responsables de l'odeur citronnée de la mélisse.

Selon GRUENWALD et *al.* [158], l'HE de la mélisse contient du citronellal et est responsable de son arôme citronné.

En effet, les caractères organoleptiques de l'HE de *Melissa officinalis* sont très appréciés en parfumerie.

3.3.4.2. Les indices physico-chimiques de l'huile essentielle

Les constantes physico-chimiques des huiles essentielles constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces constantes ont été déterminées selon un protocole précis obéissant à des normes édictées par la pharmacopée européenne et aux normes AFNOR.

Ainsi, nous avons reporté dans les tableaux 3.7 et 3.8 les résultats des caractères physico-chimiques de l'huile extraite.

a/ Indices physiques :

Le tableau 3.7 représente un état récapitulatif des résultats des caractères physiques de l'HE de *Melissa officinalis* L.

Tableau 3.7: Résultats des indices physiques

	HE de <i>Melissa officinalis</i>	Normes	Travaux antérieurs
Densité relative	0,891	0,80-0,95 Pharmacopée européenne [168] 0,872-0,92 Pharmacopée française [133]	0,9091 ABDELATIF et al. [159] 0,902 THOBY [27]
Indice de réfraction	1,448	1,45-1,513 AFNOR [170]	1,3493 ABDELATIF et al. [159] 1,488 THOBY [27]

Nous remarquons que les constantes physiques obtenues de l'HE de la mélisse sont en accord avec ceux mentionnés par les normes.

➤ Densité relative

La mesure de la densité de l'HE de *M. officinalis* effectuée à 20°C, nous montre un résultat qui s'intègre parfaitement dans l'intervalle décrit par la

pharmacopée européenne (2002) ainsi que la pharmacopée française (2012) [168, 133].

La densité obtenue est légèrement inférieure à celle rapportée par THOBY [27] et ABDELATIF et *al.* [159].

Selon SALLE [169], l'augmentation de la densité relative s'explique par la présence de certains composés caractérisés par de grandes masses moléculaires (limonène, camphre et citronellol).

➤ Indice de réfraction

L'indice de réfraction de l'HE de la mélisse obtenu est légèrement inférieur au seuil minimal de l'intervalle décrit par la norme AFNOR, 2005 [170].

Cette norme prévoit un indice de réfraction (IR), compris entre 1,450 et 1,513 pour les HE de haute qualité, et considère que celles dont l'IR dépasse le seuil de 1,513 sont de qualité moindre, et pour les HE de qualité élevée, l'indice de réfraction doit être petit [170].

La valeur obtenue est la même mentionnée par THOBY [27] et elle est supérieure à celle observée par ABDELATIF et *al.* [159].

L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés [171]. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.

Pour certains auteurs le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques [172].

b/ Indices chimiques :

Les résultats des indices chimiques sont rassemblés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8: Résultats des indices chimiques

	HE de <i>Melissa officinalis</i>	Normes	Travaux antérieurs
Indice d'acide	3,41	<2 ; AFNOR [170] <10 ; Pharmacopée européenne [168]	1,2 ABDELATIF et <i>al.</i> [159]
Indice d'ester	29,43	<76 ; Pharmacopée française [133] <76 ; Pharmacopée européenne [168]	23,59 ABDELATIF et <i>al.</i> [159]
Indice de saponification	32,84	-	-
Karl Fischer	7,23%	-	-

➤ L'Indice d'acide

L'indice d'acide (I_A) donne une idée sur le taux d'acides libres [172,173]. Une valeur élevée indique une dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un I_A inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'HE [169].

Nous avons obtenu un indice d'acide conforme aux normes décrites par la pharmacopée européenne [168], mais il demeure relativement élevé par rapport à la norme AFNOR [170] et supérieur à l'indice observé par ABDELATIF et *al.* [159], cela peut être dû à la dégradation de l'HE durant sa conservation.

➤ Indice d'ester

Nous avons obtenu un indice d'ester conforme aux normes décrites par la pharmacopée européenne [168] ainsi que la pharmacopée française [133], mais il est relativement élevé par rapport à l'indice trouvé par ABDELATIF et *al.* [159].

Selon KANKO et *al.* [172], l'indice d'ester renseigne sur la quantité des acides gras liés.

Selon AFNOR [170], plus la qualité de l'HE est élevée, plus son indice d'ester est aussi élevé.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que l'HE de la mélisse est d'une qualité acceptable en relation avec la durée de conservation.

➤ Indice de saponification et la teneur en eau

Un indice de saponification correspond à des acides gras comportant une chaîne de carbone plus longue.

Nous avons obtenu un I_s de l'HE de la mélisse de 32,84 et une teneur en eau de 7,23%.

Il y a lieu de signaler que ces deux grandeurs de l'HE de *Melissa officinalis* (Indice de saponification et la teneur en eau) n'ont pas fait l'objet de normalisation ou de travaux antérieurs à nos jours.

La teneur en eau obtenue pourrait éventuellement causer la dégradation de l'HE durant la conservation.

Certaines études ont démontré que les paramètres physico-chimiques des HE sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques [174, 49].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE ; il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE.

3.3.4.3. Composition chimique de l'huile essentielle

La connaissance de la composition chimique de l'HE, que ce soit majoritaire ou minoritaire, est d'un intérêt capital pour la suite de notre travail, dans la mesure où elle nous permettra de justifier ses potentiels thérapeutiques testés en fonction de son profil chimique.

L'analyse de l'HE de *Melissa officinalis* par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la figure 3.25 (Détails en appendice E).

HE_07_07_2015

Scan EI+
TIC
3.12e10

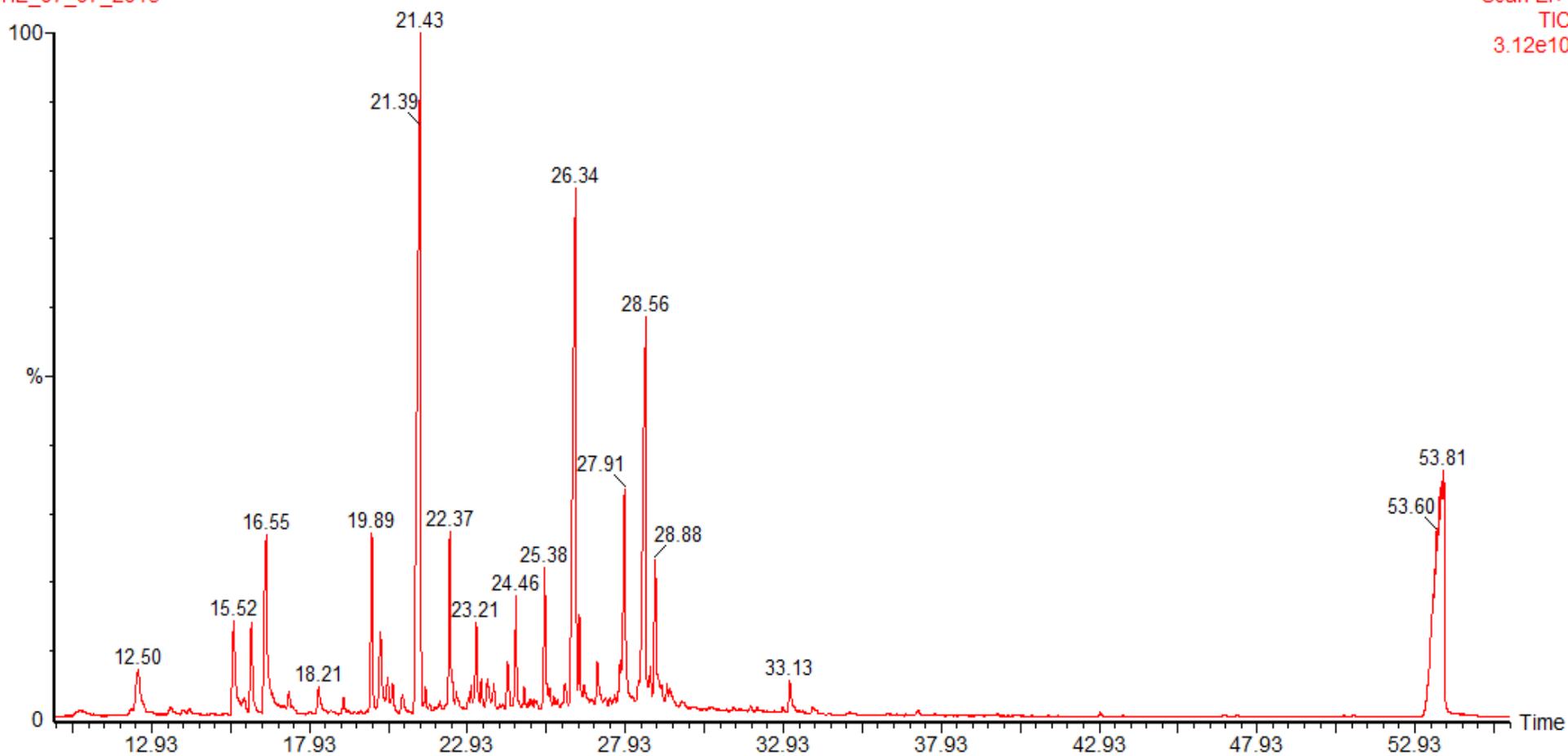


Figure 3.25: Chromatogramme de l'HE de *Melissa officinalis* L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG/SM

➤ Interprétation du chromatogramme:

Le chromatogramme issu de l'analyse de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. comporte trois pics nécessaires. Chaque pic a été soumis à une analyse par spectrophotométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

Le pic n°1, le plus important, correspond au spectre de masse du Trans (Beta) caryophyllène (Figure 3.26) qui est un sesquiterpène.

$$T_R = 21.415 \text{ mn}$$

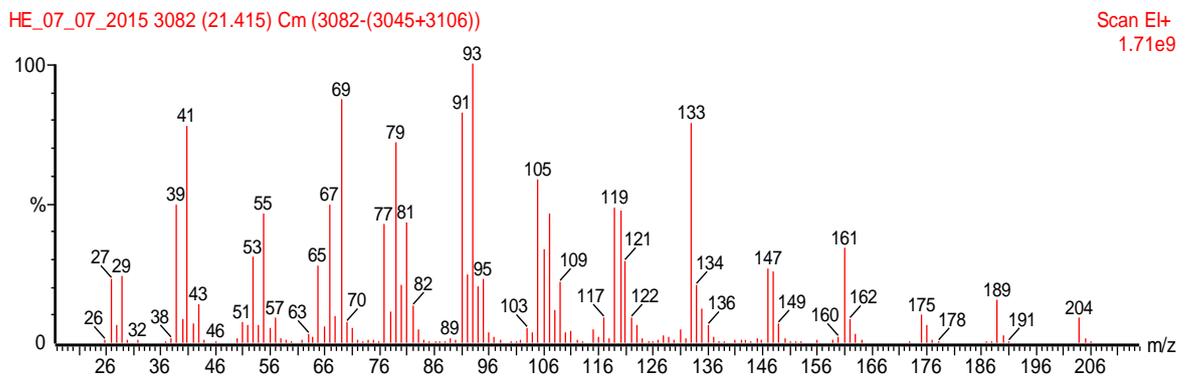


Figure 3.26: Spectre de Trans (Beta) caryophyllène

Le pic n°2, correspond au spectre de masse d'oxyde de caryophyllène (Figure 3.27) appartenant à la famille des oxydes terpéniques. C'est un stéréoisomère de l'époxyde de caryophyllène.

$$T_R = 26.316 \text{ mn}$$

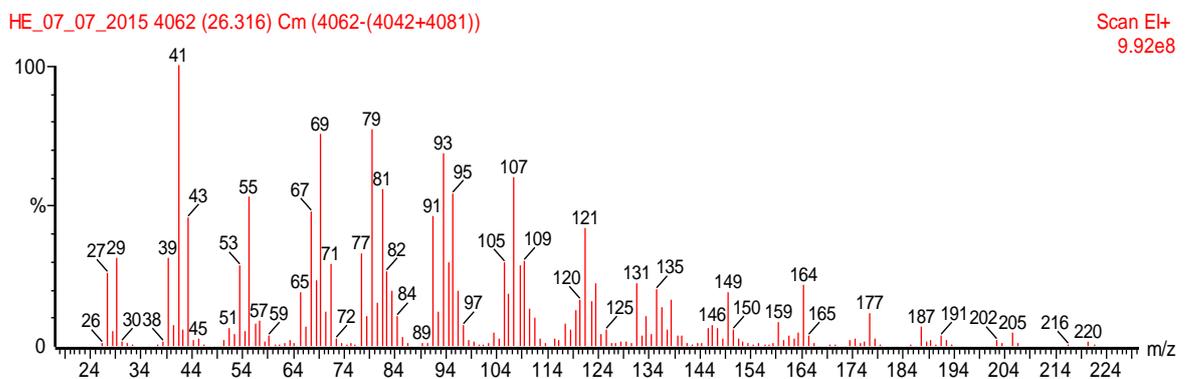


Figure 3.27 Spectre de masse de l'oxyde de caryophyllène

Le pic n°3 correspond au spectre de masse de caryophyllenol II (Figure 3.28) qui appartient à la famille des alcools terpéniques.

$$T_R = 28.522 \text{ mn}$$

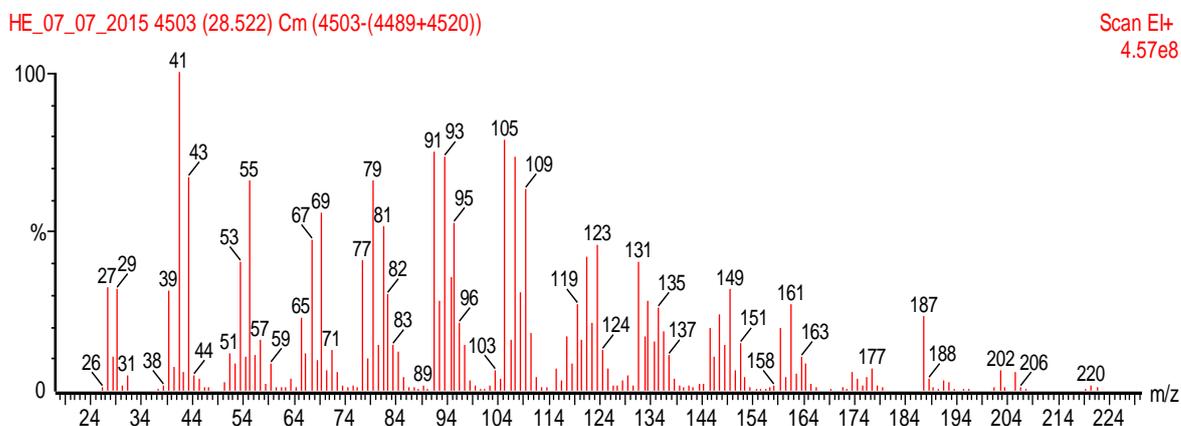


Figure 3.28: Spectre de masse de caryophyllenol II

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) de la composition chimique de l'HE sont résumés dans le tableau 3.9.

18 composés ont été identifiés, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés, dont on cite : le sesquiterpène : β -caryophyllène (19,25%), l'oxyde terpénique : oxyde de carophyllène (18,58%) et l'alcool terpénique : caryophyllenol II (10,84%).

On note la présence des sesquiterpènes suivant : α -copaène et α -humulène avec le même pourcentage (5,31%), δ -cardinène (3,54%), germacrène D (2,88%) et γ -muurolène (1,33%).

Aussi une présence non négligeable des aldéhydes terpéniques : α -citral ou géranial (5,31%), β -citral ou néral (2,66%) et citronellal (1,55%).

On note la présence des esters terpéniques, alors que les cétones sont minoritaires sous forme de traces.

Tableau 3.9: Composés de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* identifiés par CG/SM

N°	Temps de rétention (mn)	Composé identifié*	Pourcentage (%)
1	12.48	Citronnellal (ou rhodinal)	1,55
2	15.52	β -Citral (Néral ou citral b)	2,66
3	16.08	(S)-(-)- Acide Citronellique, Ester méthylique	2,43
4	16.54	α -Citral (Géranial ou citral a)	5,31
5	18.20	Géranate de méthyle	0,66
6	19.89	α -Copaène	5,31
7	20.16	cis-Myrtanol	2,21
8	21.41	Trans β -Caryophyllène	19,25
9	22.37	α -Humulène	5,31
10	23.19	Germacrène D	2,88
11	24.20	γ -Muuroène	1,33
12	24.47	δ -Cardinène	3,54
13	26.31	Oxyde de caryophyllène	18,58
14	27.04	Oxide de humulène	6,19
15	28.52	Caryophyllenol II (Caryophylla 3,8 (13) dien 5Beta-ol)	10,84
16	28. 87	(4S-5R)-5, hydroxycaryophyl-8-(1- 3) ene 4,12 époxyde	4,42
17	33.13	Hexahydrofarnesyl acétone (2-penta decanone 6, 10, 14 triméthyl)	0,66
18	53.78	Phtalate de dioctyle	6,86
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle			
Monoterpènes			-
Sesquiterpènes			37,62
Esters terpéniques			9,95
Oxydes terpéniques			29,19
Alcools terpéniques			13,05
Aldéhydes terpéniques			9,52
Cétones			0,66
TOTAL			99,99

*Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP-5MS,

L'analyse chromatographique de l'HE de *Melissa officinalis* a montré une grande diversité de constituants appartenant à différentes familles de composés chimiques avec une prédominance des sesquiterpènes.

Cependant, selon RONAT [175], les principaux travaux réalisés sur la composition de l'HE de mélisse émanant de chercheurs allemands, suisses et égyptiens (s'échelonnant de 1982 à 1997), ayant extrait l'HE par entraînement à la vapeur d'eau à partir des feuilles séchées de *M. officinalis*, ont obtenu des proportions élevées en monoterpènes (Tableau 3.10).

Tableau 3.10: Teneurs des principales familles de constituants de l'HE de *M. officinalis* selon chaque étude

Les familles des constituants de l'HE (%)	Notre étude	TITTEL et al. [176]	MULKENS et al. [177]	SCHULTZE et al. [178]	SHALABY et al. [179]	HOSE et al. [180]
Les monoterpènes	-	70,40	67,20	56,30	72,77	65,55
Les sesquiterpènes	37,62	19,30	1,32	35,30	4,95	29,12

Nos résultats sont aussi différents de ceux obtenus par SCHNITZLER et al. [181], qui ont examiné la composition chimique de l'HE de la mélisse d'origine Allemande. Ils ont trouvé une dominance des aldéhydes monoterpéniques.

Ainsi, ABDELATIF et al. [159], ont caractérisé l'HE de la mélisse d'origine de la wilaya d'Alger et extraite par hydrodistillation, ils ont observé une prédominance des aldéhydes monoterpéniques (44,20% de gèranial, 30,20% de néral et 6,30% de citronellal).

BOUNIHI et al. [182], ont trouvé que la composition de l'HE obtenue par hydrodistillation des feuilles fraîches de la mélisse d'origine marocaine est : Nerol (30,44%), citral (27,03%), isopulegol (22,02%), caryophyllène (2,29%) et oxyde de caryophyllène (1,24%).

De plus, les travaux de ABDELATIF et *al.* (Alger 2014) et BOUNIHI et *al.* (Maroc 2013), ainsi que d'autres travaux de différents pays (tableau 3.11) ont rapporté que l'un des principaux constituants de l'HE de *M. officinalis* est le néral et le géranial, auquel peut s'ajouter le citronellal comme composés majoritaires [159, 160, 179, 182, 183, 184, 185, 186, 187].

Cependant, le limonène (57,5%) est le composant principal dans les échantillons d'Ecosse, le néral a été trouvé avec seulement (4,3%) et le géranial est complètement absent [188].

D'autre part, nous avons remarqué que l'HE de la mélisse d'origine de Hammam Melouane a été caractérisée par la présence de teneurs importante en β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène. Ce résultat se rapproche de ceux de ALLAHVERDIYEV et *al.* (Turquie 2004) et BASTA et *al.* (Grèce 2005) [189, 190].

Tableau 3.11: Variation des principaux constituants de l'HE de *M.officinalis* selon différentes origine

Constituants	Origine / Année										
	Notre étude	Egypte 1995 [179]	Ecosse 1995 [188]	Slovaquie 1997 [183]	France 1998 [184]	Cuba 1999 [185]	Iran 2003 [160]	Serbie 2004 [186]	Turquie 2004 [189]	Brésil 2005 [187]	Grèce 2005 [190]
Citronellal	1,55	13,3	24,9	11,3	39,5	0,2	12,9	13,7	2,9	-	-
Néral	2,66	19,7	4,3	22,2	20,4	29,9	24,5	16,4	5,8	39,3	-
Géranial	5,31	26,8	-	33,6	27,8	41,0	35,5	23,4	6,6	47,3	-
β -Caryophyllène	19,25	4,9	-	4,2	2,4	-	4,9	4,6	14,2	0,9	15,3
Oxyde de caryophyllène	18,58	10,0	-	8,3	-	5,3	2,7	1,7	-	1,2	12,6

La différence de composition constatée est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la

période de la récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, la méthode d'extraction et la conservation de l'HE [191].

ROMBI [192], a rapporté qu'une étude portant sur plusieurs échantillons d'origines diverses a permis d'identifier 70 constituants dont sept représentent 96% de l'HE : le géraniol et le néral, le citronellal, l'acétate de géranyle, le β -caryophyllène et son époxyde, le méthylhepténone.

A l'exception de l'acétate de géranyle et le méthylhepténone, les autres composés sont présents dans notre HE.

Et selon WICHLT et ANTON [10], les autres constituants marquants sont le germacrène D, le citronellate de méthyle, l' α -copaène, le nérol, le linanol, le géraniol et le citronellol.

L'HE de ce travail présente en plus du germacrène D et l' α -copaène des sesquiterpènes non identifiés par des travaux ultérieurs dans l'HE de la mélisse tel que α -Humulène, δ -Cardinène et γ -Muuroène.

En comparant la composition de cette HE avec celles de travaux antérieurs, on constate qu'elle appartient au chémotype: Caryophyllène/Alpha humulène, avec une présence marquée de citral, alpha-copaène, δ -Cardinène et de germacrène D.

Selon WICHLT et ANTON [10], la teneur en β -Caryophyllène peut atteindre jusqu'à 28% et au cours de la conservation elle se transforme en époxydes de caryophyllène et germacrène D jusqu'à 15%, ce qui peut expliquer nos résultats.

Le caryophyllène (ou β -caryophyllène, ou encore (-)-trans-caryophyllène) est un sesquiterpène bicyclique très important. Plusieurs travaux ont démontré son effet anti-inflammatoire et antiallergique et possède une activité analgésique avec des effets gastriques cytoprotectifs [193, 194, 195, 196]. Ce résultat nous conduit à dire qu'éventuellement cette HE peut être utilisée dans les domaines de la pharmacie et de la médecine et ceci rajoute un important potentiel thérapeutique à l'HE originaire de Hammam Melouane.

Partie 3.4

RESULTATS DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'ensemble des résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH sont présentés en détail en Appendice F (tableaux 1, 2, 3, 4 et 5).

3.4.1. Résultats de l'absorbance du DPPH

Mesurée à 517 nm, l'absorbance du DPPH dans les témoins positifs en l'occurrence le Butyl-hydroxy-toluène « BHT » (antioxydant de synthèse) et le tocophérol « vitamine E » (antioxydant naturel), présente une diminution considérable en fonction de la concentration.

La même réponse est obtenue avec l'HE et l'extrait méthanolique de *M.officinalis* (Figures 3.29 et 3.30).

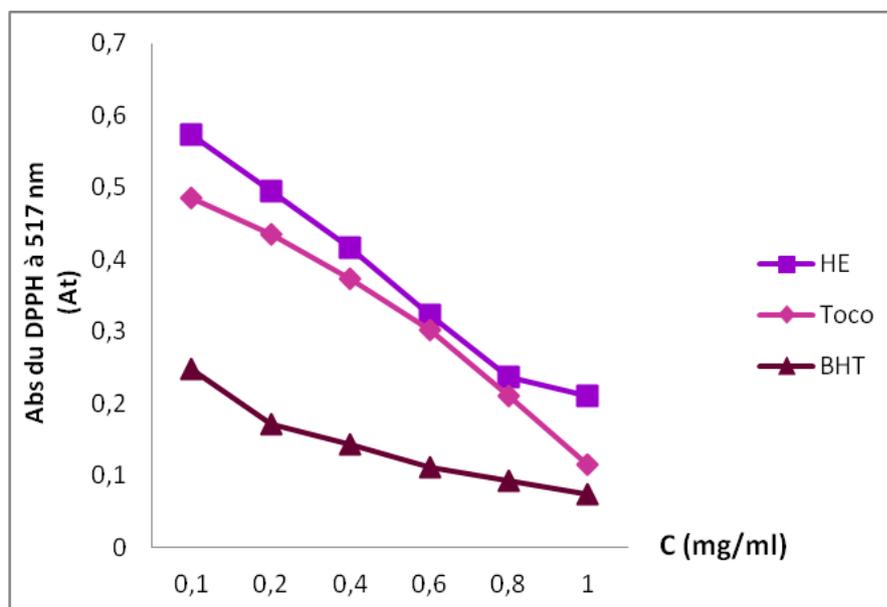


Figure 3.29: Evolution de l'absorbance des solutions des témoins et l'HE de la mélisse

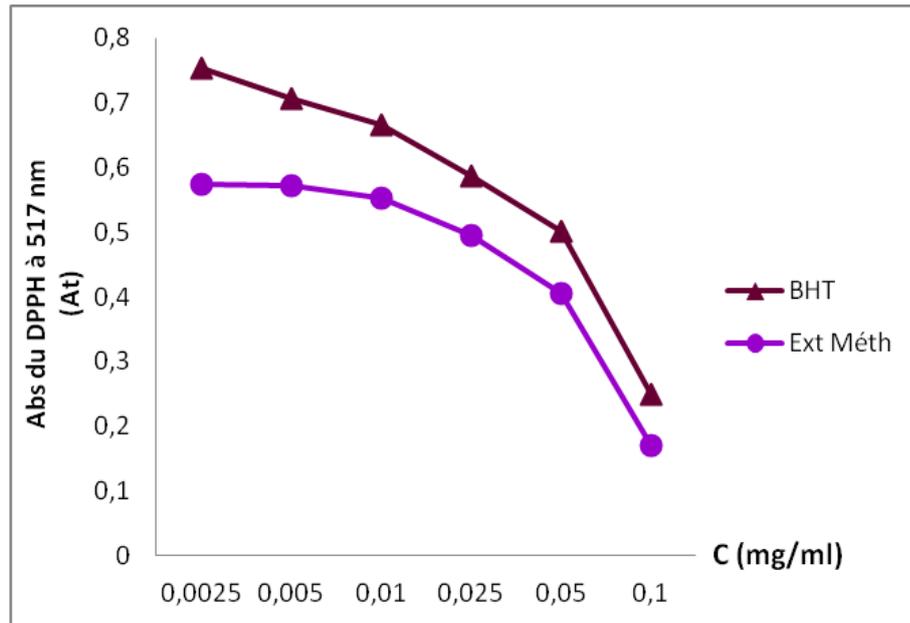


Figure 3.30: Evolution de l'absorbance de la solution du témoin et l'extrait méthanolique de la mélisse

3.4.2. Evolution de l'inhibition radicalaire

Les résultats de l'activité antioxydante exprimés par le profil de l'activité antiradicalaire de chaque substance testée vis-à-vis du radical DPPH sont présentés dans les figures 3.31 et 3.32.

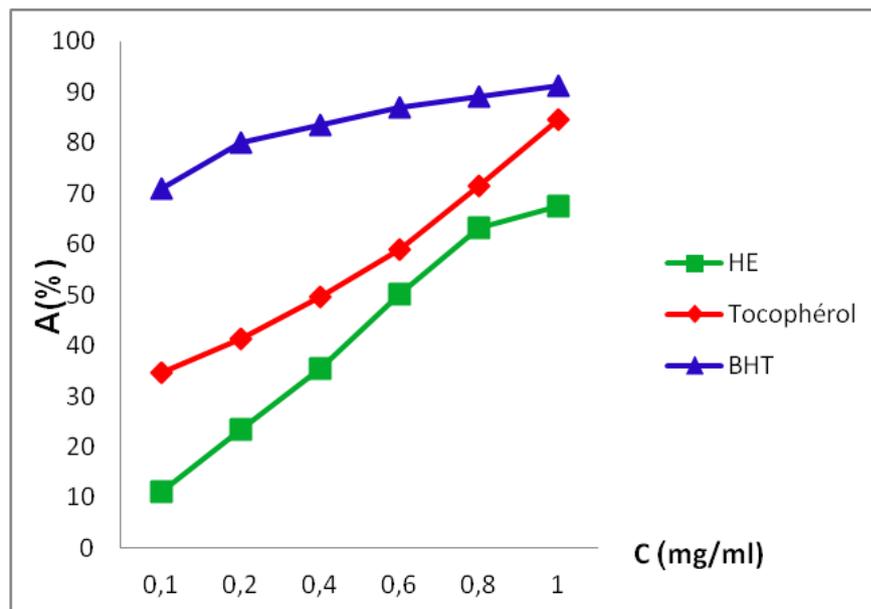


Figure 3.31: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des témoins testés et l'HE de la mélisse

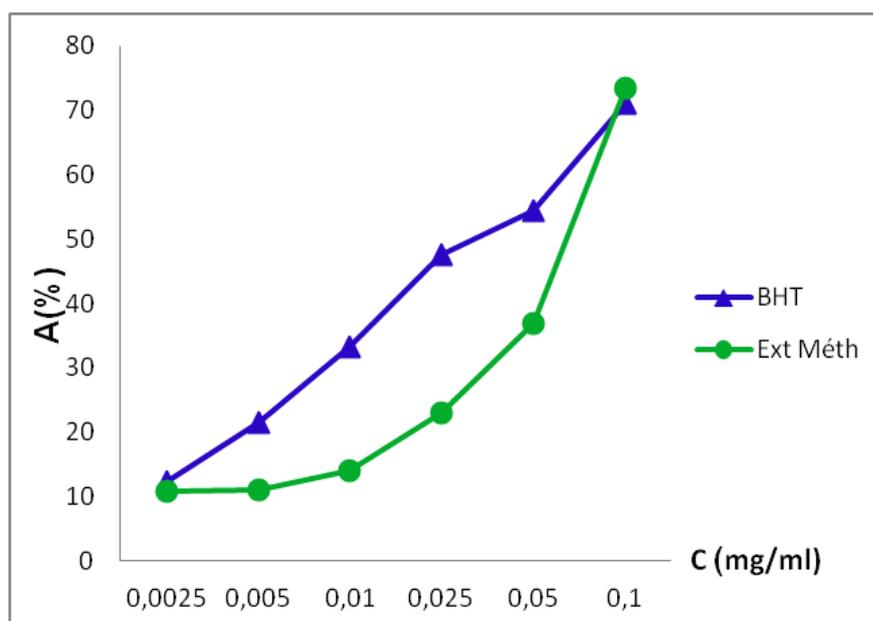


Figure 3.32: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire du témoin et l'extrait méthanolique de la mélisse

Les pourcentages de l'inhibition radicalaire sont représentés en appendice F (tableaux 6 et 7).

Ces résultats révèlent que tous les substrats testés possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante.

Le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration des substrats.

Ainsi, pour une faible concentration 0,1mg/ml, le pourcentage de l'inhibition radicalaire atteint 73,47% par l'extrait méthanolique et 71,02% par le BHT.

Cependant, une concentration élevée de 1mg/ml, le pourcentage de l'inhibition radicalaire atteint 67,46% par l'HE et 84,47% par le tocophérol ainsi qu'une réduction presque totale de l'ordre de 91,27% par le BHT.

3.4.3. Estimation du pouvoir antioxydant des extraits de mélisse

L'activité inhibitrice des extraits de mélisse exprimée par IC_{50} est illustrée par les figures 3.33 et 3.34.

Les IC_{50} exprimant la concentration efficace du substrat antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH mises en solution dans le méthanol, ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire (Appendice F).

La validité de ces régressions est testée par les coefficients de corrélation qui doivent être très proches de 1,00.

Selon GHEDADBA *et al.* [197], une valeur plus faible de l' IC_{50} indique une activité antioxydante plus élevée.

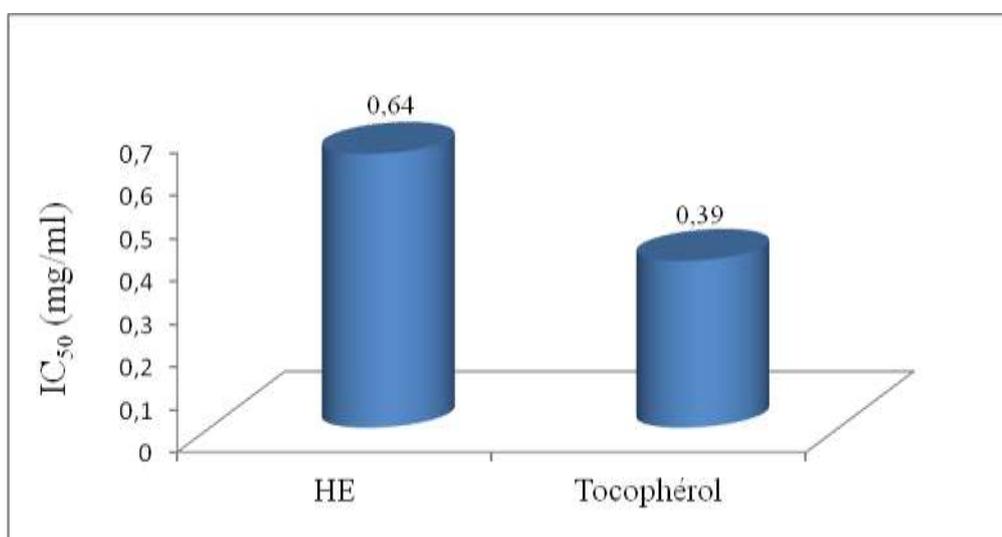


Figure 3.33: Concentration inhibitrice à 50% de l'HE de la mélisse et le tocophérol

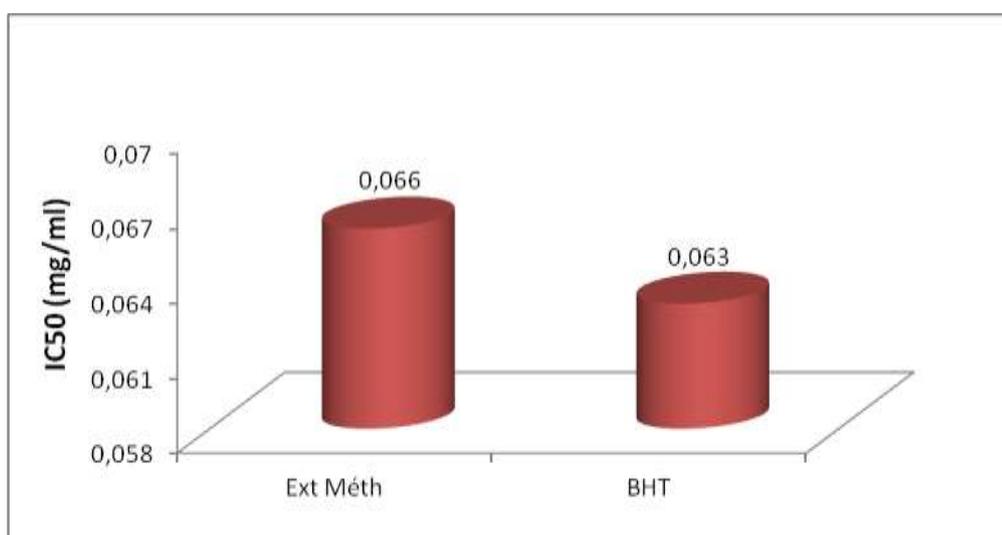


Figure 3.34: Concentration inhibitrice à 50% de l'extrait méthanolique et le BHT

Comme représenté dans la figure 3.34, les valeurs d'IC₅₀ sont très faibles pour l'extrait méthanolique et le BHT de l'ordre de 0,06 mg/ml. Ces derniers sont d'excellents antioxydants.

D'autre part, les valeurs des concentrations inhibitrices IC₅₀ montrent une activité assez importante de l'HE (IC₅₀ = 0,64 ± 0,01 mg/ml) et le tocophérol (IC₅₀ = 0,39 ± 0,01 mg/ml) puisqu'ils agissent à des concentrations élevées.

Toutefois, le BHT et l'extrait méthanolique présentent une activité antiradicalaire avec un IC₅₀ largement inférieur à celui de l'HE et du tocophérol.

L'analyse des valeurs IC₅₀ par ANOVA a révélé une différence très hautement significative (P<0,001). Le test post-hoc de Tukey a donné des différences significatives (p<0,05) entre l'HE et les deux standards, ainsi on peut dire que l'activité du BHT est significativement la plus élevée par rapport à celle du tocophérol et de l'HE.

Par contre le test de Tukey n'a pas donné de différence significative entre l'extrait méthanolique et le BHT.

Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire a été calculé, nommé "PAR" qui est égale à 1/EC₅₀ (tableau 3.12). Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus le pouvoir anti-oxydant augmente.

Tableau 3.12: Puissance antioxydante de différentes substances testées

Substances	ARP *
BHT	15,958 ± 0,121
Tocophérol	2,559 ± 0,067
Extrait méthanolique	15,103 ± 0,649
HE	1,547 ± 0,020

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

En comparant le résultat obtenu avec les extraits de la mélisse et les standards, on peut classer l'activité et la puissance antioxydante selon l'ordre suivant : BHT > Extrait méthanolique > Tocophérol > Huile essentielle.

L'HE a manifesté un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH mais cette capacité est d'une puissance faible en comparaison avec les contrôles positifs.

L'extrait méthanolique a manifesté un excellent pouvoir antioxydant avec une puissance très proche de celle du BHT.

Par ailleurs, nos résultats de l'activité antiradicalaire de l'HE sont en accord avec ceux de DE SOUSA et *al.* [198], qui ont confirmé que l'HE de la mélisse d'origine Brésilienne présente une activité antioxydante par le piégeage du radical DPPH, et sont aussi similaires aux résultats de BOUNIHI [152] qui a montré que l'HE de la mélisse d'origine Marocaine présente une faible activité antioxydante avec une $IC_{50} = 1,75 \pm 0,03$ mg/ml.

Selon TSIMOGIANNIS et OREOPOULOU [199] et KOURI et *al.* [200], le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant [201], ce qui explique la puissance élevée du BHT et du tocophérol par rapport à nos extraits notamment l'HE de la mélisse.

L'HE de *Melissa officinalis* possède une activité antiradicalaire qui est liée à sa composition chimique. Ainsi, il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu. Les travaux de RUBERTO et BARATTA [202], relatifs à l'activité antioxydante de 98 composants chimiques purs des huiles essentielles ont montré que les hydrocarbures terpéniques avaient un effet antiradicalaire significatif, et les travaux de LEGAULT et PICHETTE [203], ont montré que le β -caryophyllène est un antioxydant.

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de la mélisse est liée à sa composition phénolique. Ainsi, nos résultats concordent avec les résultats d'ONDREJOVIC et *al.* [204], qui ont montré une bonne activité antioxydante de l'extrait des polyphénols des feuilles de la mélisse.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont attribué l'effet antioxydant de la plante *Melissa officinalis* à sa richesse en acide rosmarinique [184, 205, 206, 43, 207, 208, 209].

D'après MENCHERINI et *al.* [210], l'acide rosmarinique possède une forte activité antioxydante, mesurée par réduction du radical libre DPPH et il a présenté une IC₅₀ de 3,1 µg/ml.

Nous pouvons donc supposer que l'extrait méthanolique de la Mélisse présente une capacité de neutralisation du radical libre DPPH appréciable en comparaison à l'HE.

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'extrait méthanolique est riche en composés phénoliques notamment les tanins et flavonoïdes. Ces derniers sont d'excellents antioxydants naturels ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène [211]. Au contraire, l'activité antioxydante des HE de la mélisse est très faible car elle est riche en composés terpénoïdes représentés par les sesquiterpènes.

Nous pouvons dire que la mélisse présente une activité antioxydante et que la faculté de piéger le radical libre DPPH est puissante avec l'extrait méthanolique mais elle est modérée pour l'HE.

Partie 3.5

RESULTATS DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Le diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes est exprimé en millimètre. Cette sensibilité est sous la dépendance de la composition chimique en métabolites bioactifs typiques de chaque extrait.

Il est à signaler que le diamètre du disque est inclus dans la mesure de la zone d'inhibition (Appendice G).

3.5.1. Test des contrôles positifs

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.

Nous avons testé l'activité du ciprofloxacine qui est un antibiotique appartenant à la famille des quinolones ayant un large spectre d'activité.

Les résultats des mesures des zones d'inhibition figurent dans le tableau 3.13.

Tableau 3.13: Résultats de l'antibiogramme

Souches	ATB	Ciprofloxacine (mm)	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>		31,33 ± 0,94	Sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		38,33 ± 1,70	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i>		35,00 ± 0,82	Sensible
<i>Bacillus subtilis</i>		14,67 ± 0,47	Intermédiaire
Levure	Antifongique	Amphotéricine B	Interprétation
<i>Candida albicans</i>		16,00 ± 1,41	Sensible

Toutes les souches bactériennes ont montré une sensibilité vis-à-vis de l'ATB. Néanmoins, *Bacillus subtilis* a présenté une sensibilité intermédiaire.

Concernant la levure *Candida albicans*, une zone moyenne d'inhibition de 16mm a été obtenue sous l'action de l'antifongique "Amphotéricine B".

3.5.2. Test du pouvoir antimicrobien des extraits de la plante

a/ L'activité antimicrobienne de l'HE

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Melissa officinalis* L. sont consignés dans le tableau 3.14.

Tableau 3.14: Résultats de l'aromatogramme

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	16,33 ± 0,47	Très sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37,17 ± 0,62	Extrêmement sensible
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,17 ± 0,62	Extrêmement sensible
<i>Bacillus subtilis</i>	19,00 ± 0,82	Très sensible
<i>Candida albicans</i>	45,17 ± 0,24	Extrêmement sensible

Nous pouvons remarquer la présence de zones d'inhibition importantes au niveau de toutes les souches microbiennes testées. Ce résultat montre l'efficacité de l'HE de la mélisse sur l'inhibition de la croissance des germes testés.

Nous avons observé que l'HE de la mélisse agit fortement sur *P. aeruginosa*.

Ainsi, une excellente activité antifongique de l'HE a été observée, qui pourrait être meilleure que celle de l'activité antifongique de référence, en l'occurrence « Amphotéricine B ».

b/ L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* L. a été dilué dans l'éthanol et parallèlement, nous avons utilisé un témoin où seul l'éthanol a été utilisé. Les résultats de l'activité antimicrobienne sont consignés dans le tableau 3.15.

Tableau 3.15: Effet de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. sur les souches microbiennes.

Souches	Ethanol	Extrait méthanolique	
	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	0	0	Résistante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	Résistante
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	Résistante
<i>Candida albicans</i>	0	13,17 ± 0,85	Sensible

Testé sur tous les germes étudiés, l'éthanol (témoin) n'a pas d'effet antimicrobien. L'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. dilué inhibe uniquement la levure *C. albicans* dont on observe une relative sensibilité, mais n'a aucune influence sur les autres souches. Ce résultat serait éventuellement dû à une forte dilution par l'éthanol de l'extrait polaire de la mélisse.

➤ Interprétation des résultats :

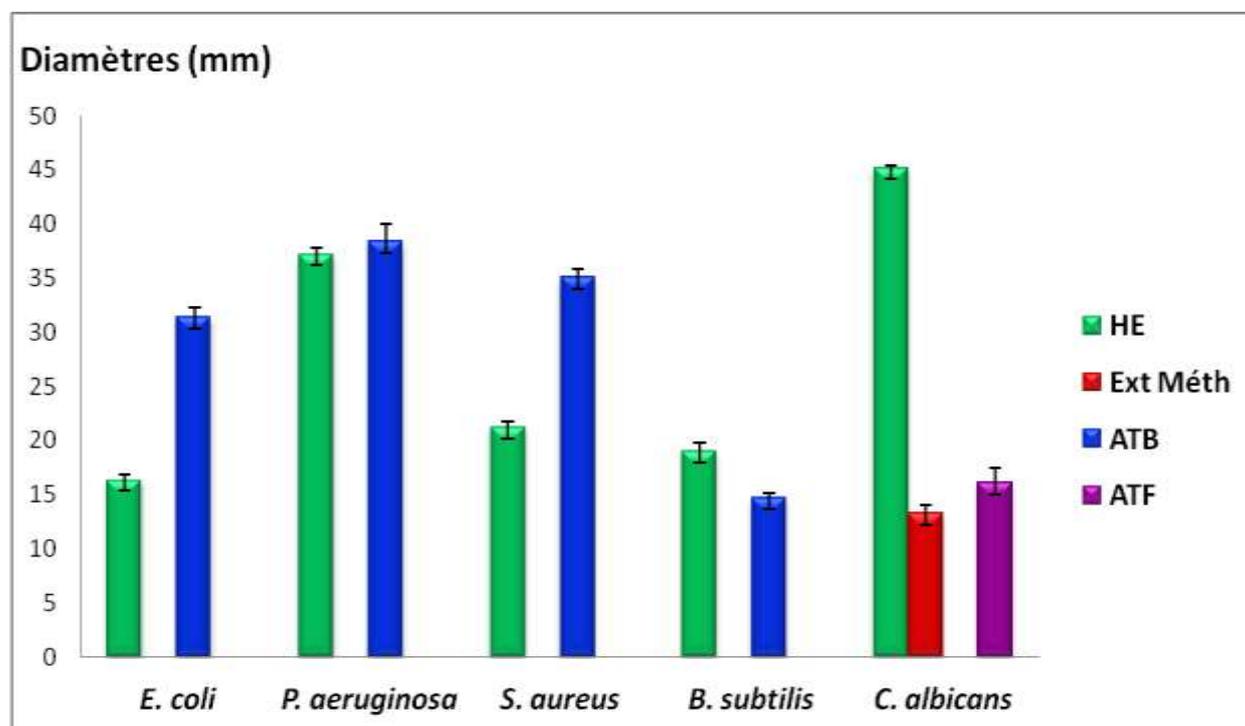


Figure 3.35 : Activité antimicrobienne des extraits de la mélisse

Les résultats illustrés par la figure 3.35, indiquent que l'HE de *Melissa officinalis* L. possède une bonne activité contre les microorganismes testés, elle se rapproche de celle de l'ATB Ciprofloxacine.

Il est communément connu que les huiles essentielles sont plus actives contre les bactéries Gram positives que contre les Gram négatives [212].

Les bactéries Gram négatives présentent une résistance liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positives [213, 214].

Dans notre cas, l'HE de *Melissa officinalis* pourrait échapper à ce constat. Les bactéries Gram négatives ont été beaucoup plus sensibles que les bactéries Gram positives et l'HE de la mélisse est plus active contre *Pseudomona aeruginosa* (qui est une bactérie Gram négatif) avec une zone d'inhibition de 37mm. Cette souche est connue selon les travaux de LIVERMORE [215], pour sa capacité à acquérir facilement des résistances par mutation vis-à-vis de divers classes d'antibiotiques, ce qui confère à l'HE de la mélisse de puissantes propriétés antibactériennes.

Ce résultat corrobore avec ceux obtenus par ABDELATIF et *al.* [159], qui ont évalué effet antimicrobien de l'huile essentielle de la mélisse d'Alger obtenue par hydrodistillation et ont enregistré un important effet de l'HE sur les bactéries à Gram négatif.

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs composants est leur hydrophobicité, qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, de perturber les structures et de les rendre plus perméables [216, 217]. Des fuites d'ions (tel que le potassium K^+) et d'autres contenus cellulaires tel que les mitochondries peuvent alors se produire [218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225].

Bien qu'une certaine quantité de fuites de cellules bactériennes puisse être tolérée sans perte de viabilité, une perte importante de contenu cellulaire ou la sortie de molécules et d'ions critiques entraînerait la mort [226].

SADRAEI et *al.* [160], ont rapporté que l'HE de la mélisse présente non seulement des activités antibactériennes, mais aussi anti-parasitiques et antifongiques.

Nos résultats sont similaires aux investigations d'une équipe espagnole portées sur l'HE de plusieurs Lamiacées dont la mélisse, obtenue par distillation des parties aériennes et qui ont révélé que *M. officinalis* présente 100% d'inhibition sur les levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les auteurs ont également relevé 75 % d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, et une action inhibitrice sur les colonies d'*Escherichia coli*. Les essences possèdent un degré d'activité similaire vis-à-vis des micro-organismes testés, bien qu'une activité relativement plus élevée ait été observée dans le cas de *M. officinalis* [227].

L'HE de la mélisse représente un mélange complexe de différents composants chimiques. Le citral a de fortes propriétés antimicrobiennes [228]. Les travaux de MESA-ARANGO et al. [229], sur du citral commercial, composé de 40% de néral et 60% de géraniol, ont trouvé qu'il possède une activité antifongique à l'égard d'*Aspergillus fumigatus* et *Candida krusei* avec une CMI respective de 62,5 µg/ml et 39,4 µg/ml.

Selon ABDELATIF et al. [159], cette activité antimicrobienne de l'HE totale ne peut être réduite aux composants majeurs. D'autres composants peuvent contribuer à cette activité.

Il serait légitime de déduire, d'après nos résultats, que l'activité antimicrobienne de l'huile testée résulte de la synergie de ses composants.

Les résultats de l'activité antibactérienne de la concrète polaire de *Melissa officinalis* obtenus sont négatifs. L'extrait n'a eu aucun effet contre les bactéries examinées.

Selon CUSHNIE et LAMB [230], plusieurs paramètres peuvent influencer sur la détermination de l'activité antimicrobienne tel que le type de micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives.

L'activité antimicrobienne des principes actifs est liée aux procédés d'extraction. Il semble que la chaleur est responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles

[231]. Ainsi, la possibilité de dégradation des composés à cause d'une surchauffe locale est un des inconvénients de l'extracteur Soxhlet.

Les travaux de KANYONGA et *al.* [232] ainsi que ceux de ULUKANLI et AKKAYA [233], sur l'activité antimicrobienne du *Marrubium vulgare* appartenant à la famille des Lamiacée, ont révélé que les souches microbiennes ne réagissent pas de la même manière face aux différents composés polyphénoliques; elles sont sensibles aux tanins et résistantes à l'extrait brut méthanolique.

SREENIVASA RAO et *al.* [234] et ARUN KUMAR et RENGASAMY [235] ont suggéré de fractionner cet extrait, puisqu'il y aurait des composés inhibiteurs masquant les composés actifs.

Les résultats obtenus dans ce travail se rapprochent de ceux de BOUNIHI [152], qui a révélé l'inefficacité de l'extrait aqueux de *Mélissa officinalis* vis-à-vis de l'ensemble des souches testées alors que l'HE s'est avérée active contre toutes les souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Esherichia coli*) avec une zone d'inhibition allant de 20 à 46mm.

Par ailleurs, les travaux de MENCHERINI et *al.* [210], ont montré que l'acide rosmarinique possède une importante activité antibactérienne et une faible activité antifongique.

D'après nos résultats, l'HE et l'extrait méthanolique agissent sur la levure *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 45mm. Nous pouvons suggérer que la mélisse présente une bonne activité antifongique.

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les HE, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort [236].

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antibiotiques. Globalement, nous constatons que *Melissa officinalis* présente une bonne activité antimicrobienne notamment son huile essentielle.

Partie 3.6

RESULTATS DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Les indications traditionnelles, nous ont incité à tester *in vivo* l'huile essentielle de *Melissa officinalis*, sur un modèle animal adapté à l'étude des propriétés anti-inflammatoires.

Nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aiguë « le test de l'œdème à la carraghénine ». Celle-ci est injectée dans la région plantaire de l'une des deux pattes postérieures de la souris. Cette technique a été choisie en raison de sa simplicité d'exécution, de la rapidité d'apparition des effets ainsi que sa reproductibilité.

Les résultats de l'évolution de l'inflammation chez les groupes témoins et essais sont consignés dans le tableau 3.16.

Tableau 3.16 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'HE de *Melissa officinalis*

Les lots (n=6 souris/lot)		Pattes postérieures des souris	Poids moyen m ± σ (g)	% AUG	% RED
Témoin	Lot témoin négatif (eau physiologique/ 0,9% Na Cl) + carraghénine	PPD	0,140 ± 0,002	19,643	/
		PPG	0,168 ± 0,004		
Référence	Lot témoin positif (Cloféna [®] 25mg/ml) + carraghénine	PPD	0,137 ± 0,002	11,057	43,709
		PPG	0,152 ± 0,002		
HE	Lot essai 1 (HE à 0,1 g/ml) + carraghénine	PPD	0,135 ± 0,002	8,798	55,210
		PPG	0,146 ± 0,004		
HE	Lot essai 2 (HE à 0,01 g/ml) + carraghénine	PPD	0,137 ± 0,001	19,441	1,027
		PPG	0,164 ± 0,005		

Chaque lot de souris a reçu préalablement de l'HE à deux doses différentes (0,1g/ml et 0,01g/ml), du Clofénal (témoin positif) ou de l'eau physiologique (témoin négatif).

L'injection de la carraghénine à 1%, dans la patte postérieure gauche des souris, provoque une inflammation immédiate et persistante. Elle consiste en l'apparition d'un œdème d'intensité variable selon les 4 lots.

Cet œdème augmente progressivement et atteint une intensité maximale après quatre heures (% AUG : 19,64% observé dans le lot témoin négatif). Ce dernier a reçu de l'eau physiologique, il présente le pourcentage d'œdème le plus élevé en comparaison avec les 3 autres lots (Figure 3.36).

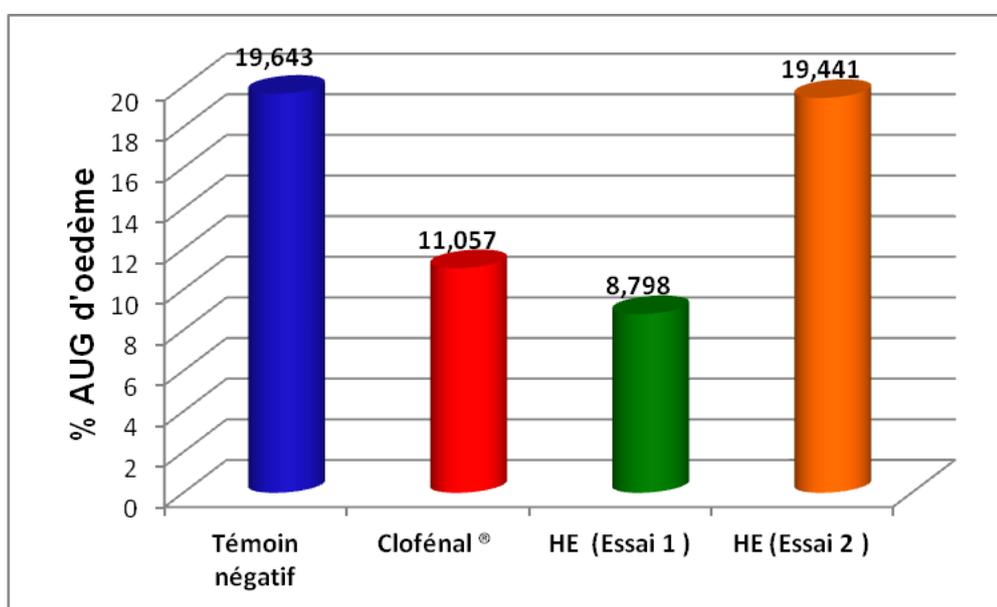


Figure 3.36 : Variation du pourcentage d'augmentation d'œdème pour chaque lot

Chez le lot de référence, le clofénal® (Diclofénac de sodium) réduit l'œdème de façon très importante (% de RED : 43,71%). L'effet inflammatoire maximal, observé après 4h, a significativement diminué chez le lot référence (% d'AUG d'œdème de 11,06%) par rapport au témoin négatif (% d'AUG d'œdème de 19,64%).

Bien que le test de l'œdème à la carraghénine constitue un modèle animal expérimental approprié pour évaluer l'effet anti-œdémateux de divers composés bioactifs tels que les extraits de plantes et les huiles essentielles [237, 238], très peu d'informations sont données sur son mécanisme.

Selon OTTERNESS et GANS [239], dans ce modèle expérimental, la distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoires seraient proches des phénomènes observés chez l'Homme. L'œdème plantaire induit par la carraghénine, est dû à la libération initiale d'histamine et de sérotonine, suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Après la première heure, les kinines agissent de manière continue et après 6 heures, les prostaglandines se montrent comme d'importants médiateurs. Cette libération des prostaglandines est associée à la migration leucocytaire vers la zone enflammée. L'œdème à la carraghénine est une des méthodes les plus utilisées, pour l'étude des potentialités anti-inflammatoires de substances et des biomolécules [240, 241].

D'après les résultats obtenus (tableau 3.16), nous observons que dans le lot témoin négatif (eau physiologique), la carraghénine entraîne une augmentation significative du poids moyen des pattes postérieures gauches ($0,168 \pm 0,004$ g), par rapport à celui des pattes postérieures droites ($0,140 \pm 0,002$ g).

Administré par voie orale, l'HE de *Melissa officinalis* a provoqué une baisse importante du pourcentage moyen de l'œdème des pattes, surtout à la concentration de 0,1g/ml, elle s'est avérée plus efficace que le produit de référence, réduisant l'œdème aigu de 55,21% (Figure 3.37).

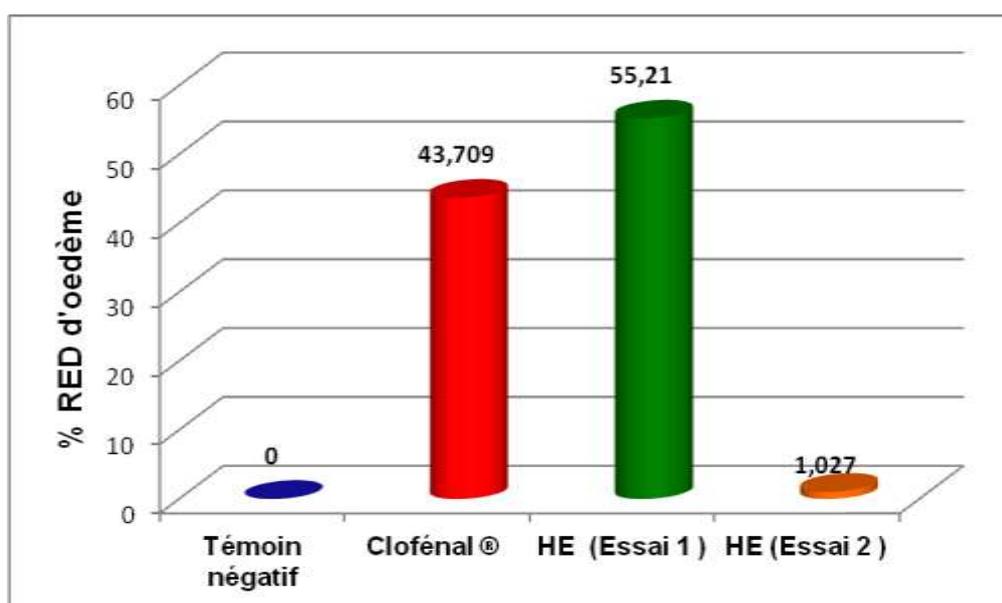


Figure 3.37 : Variation du pourcentage de réduction d'œdème pour les lots traités

Au contraire, l'HE diluée à la concentration de 0,01g/ml, a présenté un faible pourcentage de réduction de l'œdème provoqué par l'injection de la carraghénine, par rapport à celui du produit de référence « Cloféna[®] » (Figure 3.37).

L'étude comparative entre les lots traités (par l'HE à deux concentrations 0,1g/ml et 0,01g/ml) et le lot de référence (Cloféna[®]), a été réalisée à l'aide du test ANOVA I (analyse de la variance à un seul facteur). Cette étude a montré une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre les différents lots (Appendice H) confirmant ainsi, l'efficacité du traitement sur la réduction de l'inflammation induite par la carraghénine sur les pattes gauches par rapport aux pattes droites.

A l'instar de ces résultats, le test de Student-Newman-Keuls (Appendice H) révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les lots traités au Cloféna[®] et à l'HE (0,01g/ml) par rapport au témoin négatif (eau physiologique).

Par contre, ce test révèle l'absence de différence significative entre l'effet de l'HE testé à 0,1g/ml et celui du produit de référence (Cloféna[®]). Ce résultat met en évidence que l'HE de *M.officinalis* L. est un très bon anti-inflammatoire dont l'efficacité est comparable à des produits anti-inflammatoires commercialisés (Cloféna[®]).

Aussi, il convient de signaler qu'aucune différence significative n'a été observée entre le lot ayant reçu l'HE à 0,01g/ml et le témoin négatif, ce qui signifie qu'une très forte dilution de l'HE diminue son effet anti-inflammatoire.

Par ailleurs, nous pouvons constater que l'HE de *Melissa officinalis* exerce une action anti-inflammatoire comparable à celle du produit de référence. De plus, son effet est plus efficace à une concentration supérieure ou égale à 0,1g/ml.

On peut admettre également que l'HE de la mélisse, exerce un très bon effet anti-inflammatoire à visée préventive, puisqu'elle a été administrée aux souris avant d'induire l'inflammation par la carraghénine. Aussi, il est également fort probable que des concentrations plus élevées puissent empêcher complètement la formation de l'œdème et le déclenchement du processus inflammatoire.

Nos résultats se rapprochent de ceux de BOUNIHI et *al.* [182], qui ont rapporté que l'HE de la mélisse a provoqué une inhibition de l'œdème induit par la carraghénine de l'ordre de 61,76% et 70,58% pour les doses de 200 et 400mg/kg respectivement en inhibant la libération des médiateurs inflammatoires; la sérotonine et l'histamine et la suppression des prostaglandines et les cytokines.

L'effet anti-inflammatoire de l'HE de *Melissa officinalis* L. est probablement lié à sa composition en β -caryophyllène et sa richesse en sesquiterpènes notamment l' α -humulène. De nombreux travaux ont mis en évidence leur activité anti-inflammatoire [193, 195, 196].

Dans une étude menée par ROGERIO et *al.* [242], les chercheurs ont rapporté que le β -caryophyllène possède des propriétés anti-inflammatoires en curatif, et non en préventif, mais moins importantes que celles de l' α -humulène. En outre, ils ont trouvé que l'humulène administré en préventif ou en curatif, réduit d'une manière efficace l'inflammation des voies respiratoires.

Selon GERTSCH et *al.* [243], le β -caryophyllène se lie de façon sélective aux récepteurs cannabinoïdes de type 2 (CB2), exprimés essentiellement dans les tissus périphériques. Il inhibe l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire induite par le LPS. Ainsi, il réduit de façon conséquente l'inflammation induite par le carraghénane chez les souris. C'est une molécule lipophile qui traverse donc aisément les membranes cellulaires.

Il y a lieu de signaler aussi que le citral a fait l'objet de recherches qui ont montré son pouvoir anti-inflammatoire [238, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251].

A la lumière de cette étude, on suppose que ces résultats sont liés à la richesse de l'HE de la mélisse en composés sesquiterpéniques qui sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires, ainsi que la présence simultanée de plusieurs composés actifs, ce qui peut la rendre plus performante que les anti-inflammatoires de synthèse largement utilisés en thérapeutique.

Partie 3.7

RESULTATS DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTISPASMODIQUE

La littérature scientifique cite souvent les propriétés sédatives et antispasmodiques de la mélisse, les considérant même comme étant ses principales activités, or peu d'articles font état d'études à ce sujet. Les travaux mettant en évidence ces propriétés remontent aux années 1970 [252].

Afin de contribuer à l'évaluation des propriétés antispasmodiques de la mélisse, nous avons utilisé le « *test de Writhing* » pour mettre en évidence l'analgésie de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L.

Il s'agit du dénombrement des spasmes ou de contorsions abdominales induites chez les souris par injection intra-péritonéale de l'acide acétique.

Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau 3.17.

Tableau 3.17 : Evaluation de l'effet antispasmodique de l'HE de *Melissa officinalis*

Les lots (n=6 souris/lot)		Nbre moyen des spasmes $n \pm \sigma$	Pourcentage de protection (%)
Témoin	Lot témoin négatif (eau physiologique/ 0,9% Na Cl)	25,2 \pm 6,20	/
Référence	Lot témoin positif (Spasfon [®] 200mg/kg)	4 \pm 1,29	84,106
HE	Lot essai 1 (HE à 0,1 g/ml)	6 \pm 1,53	76,159
HE	Lot essai 2 (HE à 0,01 g/ml)	10 \pm 1,00	60,265

D'après les résultats obtenus (tableau 3.17), Nous avons enregistré une moyenne de 25 crampes abdominales chez le lot témoin négatif induites par l'injection de l'acide acétique aux souris.

Chez le lot de référence traité au Spasfon[®], nous avons observé un nombre réduit à 4 crampes abdominales alors que l'administration de l'HE de *Melissa officinalis* L. aux deux concentrations (0,1 g/ml et 0,01 g/ml), réduit le nombre moyen des crampes abdominales jusqu'à 6 à 10 spasmes.

Nous avons remarqué qu'une concentration élevée en HE diminue le nombre de spasme (un nombre moyen de 25 spasmes a été réduit à 6 spasmes pour une concentration de 0,1g/ml en HE).

Les résultats de notre expérience ont montré que le nombre de spasmes diminuait après traitement avec l'HE de la mélisse (Tableau 3.17). D'où l'évaluation du pourcentage d'inhibition de la douleur.

La figure 3.38 illustre le pourcentage de protection de l'HE de la mélisse par rapport au lot témoin négatif en comparaison avec le médicament de référence.

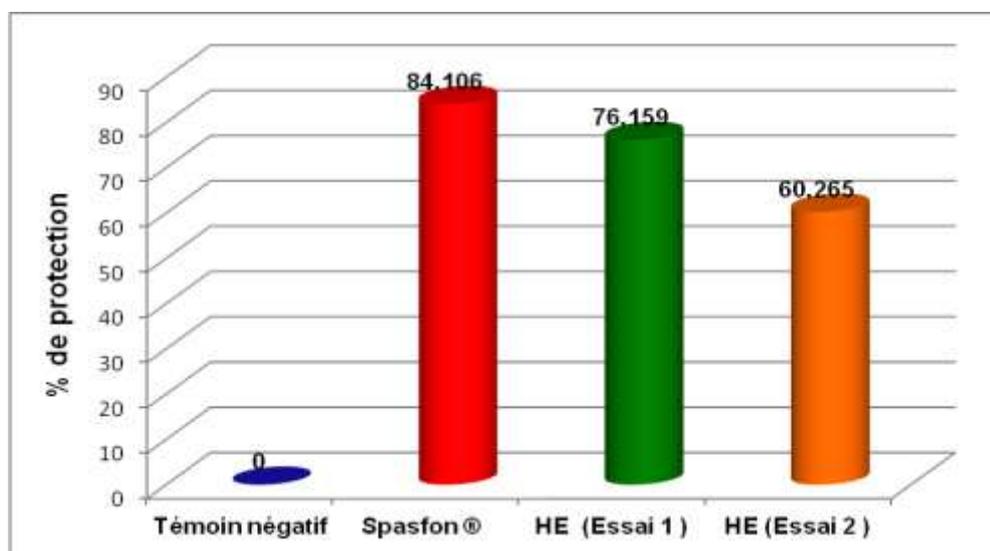


Figure 3.38 : Pourcentage de protection moyen des lots traités

L'HE de la mélisse a présenté un pourcentage de protection de 76,16% et 60,27% pour les concentrations de 0,1 g/ml et 0,01 g/ml respectivement, ces pourcentages sont proches de celui du produit de référence « Spasfon[®] » (84,11%).

L'étude comparative entre les lots traités (par l'HE aux deux concentrations) et le lot de référence, a été réalisée à l'aide du test ANOVA I (analyse de la variance à un seul facteur). Cette étude a montré une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre les différents lots (Appendice I) confirmant l'efficacité du traitement sur la réduction des contorsions abdominales.

A l'instar de ces résultats, le test de Student-Newman-Keuls (Appendice I) révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les lots traités au phloroglucinol (Spasfon[®]) et à l'HE (0,1g/ml et 0,01g/ml) par rapport au témoin négatif (eau physiologique).

Par contre, ce test révèle l'absence de différence significative entre l'effet de l'HE testé à 0,1g/ml et celui du produit de référence (Spasfon[®]). Ce résultat indique que l'HE de *M.officinalis* L. présente un pouvoir antispasmodique statistiquement similaire et comparable à des produits commercialisés (Spasfon[®]).

Aussi, il convient de signaler que l'effet analgésique de l'HE de la mélisse sur le test de contraction dépend de la dose, et elle réagit d'une manière significative même à une faible concentration de l'ordre de 0,01g/ml.

Nos résultats se rapprochent de ceux de BOUNIHI et *al.* [182], qui ont rapporté que l'HE de la mélisse a provoqué une réduction des crampes induites par l'acide acétique de l'ordre de 71,28% et 90,76% respectivement pour les doses de 200 et 400mg/kg.

L'acide acétique entraîne des contorsions abdominales qui correspondent à des douleurs périphériques [253]. HOKANSON [254] et CHAKRABORTY et *al.* [255], ont supposé que cette réponse implique des récepteurs péritonéaux locaux. Il provoque une analgésie par libération de substances endogènes qui, à leur tour, excitent les terminaisons nerveuses douloureuses [256].

Certains auteurs rapportent que la douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la libération de médiateurs pro-inflammatoires tel que la sérotonine, histamine, bradykinine, et les prostaglandines (PGE2 et PGF2 α) [257, 258, 259, 260, 261, 262, 263].

Ces médiateurs chimiques conduisent à la dilatation des artérioles et des veinules, stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent

l'augmentation de la perméabilité vasculaire, provoquant ainsi une contraction [264, 265, 266, 267, 268].

Selon WICHTL et ANTON [10], les plantes aromatiques ont des propriétés spasmolytiques de par leur contenu en HE.

SADRAEI et *al.* [160] ont rapporté que l'HE de mélisse possède des propriétés spasmolytiques car elle inhibe les contractions d'iléon de rat induites par dépolarisation avec du KCl avec une CI_{50} de 19 ng/ml. Cet effet relaxant s'observe d'ailleurs également lorsque les contractions sont induites par l'acétylcholine et par la sérotonine. Ce qui laisse supposer une interaction des composés de l'huile essentielle avec leurs récepteurs. Cette activité semble être liée à la présence de citral.

Les travaux réalisés par GHELARDINI et *al.* [193], ont révélé que le caryophyllène possède une activité analgésique avec des effets gastriques cytoprotectifs.

D'après une étude visant à mesurer l'activité spasmolytique des composants des HE, le citral a et b, le citronellal, le linalol et le caryophyllène, seraient les éléments les plus spasmolytiques de la mélisse sur la trachée. Sur l'iléon isolé, le caryophyllène est plus actif que les autres composants. Les auteurs de cette étude constatent une additivité des effets de l'HE de mélisse, par rapport aux éléments séparés. Il semble que les propriétés spasmolytiques soient plus significatives avec l'HE et avec l'eau saturée en HE qu'avec d'autres extraits [269].

Nos résultats conduiraient éventuellement à dire que la mélisse peut être utilisée dans les troubles gastro-intestinaux d'origine spasmodique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

La recherche de nouvelles plantes aromatiques à caractère thérapeutique a surtout servi à montrer le bien fondé de leurs utilisations par les tradipraticiens. Elle a démontré aussi que notre pays recèle une biomasse végétale riche et variée. Celle-ci constitue une source incommensurable pour l'élaboration et la mise au point de nouvelles molécules actives à visé thérapeutique.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressé à l'investigation d'une espèce spontanée et assez cultivée en Algérie, il s'agit de : *Melissa officinalis* L. La valorisation de ses métabolites secondaires offre de nouvelles perspectives dans l'industrie phytopharmaceutique. Cette stratégie peut contribuer au développement durable de notre pays et apporter des preuves scientifiques sur ses vertus en médecine traditionnelle.

Une meilleure connaissance de la composition des plantes semble à présent nécessaire, afin d'aider à la pérennisation de cette nouvelle filière, dont les revenus pourraient constituer une autre valeur ajoutée, surtout que ces espèces poussent spontanément et peuvent survivre pendant plus de 100 ans.

Au terme de ce travail, les objectifs que nous nous sommes assignés au départ ont été atteints, au moins en grande partie :

Les enquêtes menées sur terrain auprès de certains phytothérapeutes, herboristes et plus d'une centaine de personnes, nous ont permis de collecter des informations sur *Melissa officinalis* L. et son utilisation en médecine traditionnelle Algérienne.

L'étude macroscopique des organes de la plante a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermiques. Les coupes histologiques ont permis de connaître l'organisation des différents tissus au sein des feuilles, des tiges et pétiole. Nous avons aussi localisé les sites de stockage et de sécrétion des huiles essentielles, en l'occurrence les poils épidermiques à tête vésiculaire observés

seulement au niveau de la tige, la feuille et le pétiole. Les pièces florales stériles présentent seulement des poils épidermiques pluricellulaires tecteurs alors que, les pièces florales fertiles sont dépourvues de poils épidermiques.

Une étude phytochimique a été abordée, comportant des essais physicochimiques, visant à déterminer la teneur des principes actifs majoritaires de *Melissa officinalis* L. Nous avons cherché spécifiquement les teneurs en tanins et flavonoïdes ayant des effets thérapeutiques intéressants. La détermination quantitative de ces molécules a été réalisée à froid par une macération, ce qui a révélé une teneur importante en tanins.

L'extraction par solvants des fractions apolaires et polaires, à partir des feuilles, a été réalisée à chaud avec l'éther de pétrole et le méthanol respectivement à l'aide d'un montage de type soxhlet. L'analyse de ces concrètes par spectrophotométrie UV-visible a révélé que la fraction polaire est très riche en métabolites secondaires notamment les polyphénols, flavonoïdes et tanins.

Afin d'étudier la fraction volatile extraite par le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau, nous avons utilisé une méthodologie d'identification de la composition en couplant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CG/SM). L'utilisation de cette technique, nous a permis d'identifier quelques constituants chimiques de l'huile essentielle. Nous avons constaté, la présence d'une proportion importante en sesquiterpènes hydrocarbonés. Suite à ses résultats obtenus, nous avons attribué le chemotype Caryophyllène / α -humulène pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis*. Les sesquiterpènes caractérisant notre HE, sont très connus pour leurs vertus thérapeutiques et sont fréquemment extraits à partir des plantes, alors que leur synthèse organique est quasiment inexistante dans la littérature scientifique.

Une demande croissante en molécules d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant, par conséquent, la recherche de nouveaux composés bioactifs. Cette recherche peut prendre plusieurs formes et avoir plusieurs intérêts, mais trois objectifs majeurs reviennent souvent :

✓ Trouver de nouvelles molécules anti-microbiennes afin de remplacer les antibiotiques et anti-septiques actuels face auxquels les micro-organismes ont développés des résistances ;

- ✓ Remplacer les additifs et conservateurs synthétiques utilisés en agro-alimentaire ou en cosmétique, qui se sont révélés comme nocifs pour la santé humaine ;
- ✓ Trouver de nouvelles molécules bioactives à effet anti-inflammatoire, pour minimiser l'usage des anti-inflammatoires de synthèse (stéroïdiens et non stéroïdiens), réputés pour leurs nombreux effets indésirables.

La connaissance de la composition chimique de l'HE de *M.officinalis* ainsi que l'extrait méthanolique, nous ont permis d'élucider certains effets biologiques et pharmacologiques intéressants, notamment les effets antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire, et antispasmodique :

L'huile essentielle de la mélisse a présenté un modeste pouvoir antioxydant ($IC_{50}=0,64\pm 0,01$ mg/ml). Cependant, l'extrait méthanolique des feuilles de *M. officinalis* a présenté un pouvoir réducteur, qui est comparable à celui exprimé par l'antioxydant de synthèse « BHT ». Il a exprimé un excellent effet en piégeant plus de 70% des radicaux DPPH à une faible concentration (0,1mg/ml). Cet extrait a présenté une activité antioxydante très intéressante ($IC_{50}=0,066\pm 0,003$ mg/m). Cette action a été corrélée à la présence de composés phénoliques dans les feuilles. Toutefois, une analyse structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN) est nécessaire pour identifier tous les constituants de cette fraction.

Les différents extraits de la plante ont été testés sur un panel de microorganismes pathogènes. Cependant, l'HE a exercé le meilleur effet antimicrobien avec des zones d'inhibition allant de 16 à 45 mm. L'extrait préparé à partir de la concrète méthanolique vient en deuxième position car, la quasi-totalité des souches bactériennes se sont avérées résistantes, néanmoins il présente un pouvoir antifongique.

Sur un autre volet, l'évaluation des activités pharmacologiques testées *in vivo* a révélé que l'huile essentielle de *Melissa officinalis* est douée d'un bon effet anti-inflammatoire. Ainsi, une concentration de 0,1g/ml d'HE induit une activité significative similaire à celle du produit de référence utilisé avec un pourcentage de réduction de l'œdème dépassant les 50%.

Nous venons par ce travail, de justifier scientifiquement l'utilisation traditionnelle de *M. officinalis* dans le traitement antispasmodiques. L'huile essentielle de la mélisse a présenté un excellent effet antispasmodique avec un pourcentage de protection allant de 60 à 76%.

Ainsi les activités antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoires et antispasmodique positives avec l'HE de *Melissa officinalis* L, apportent des éléments de validation scientifique et justifient son utilisation traditionnelle dans le traitement de diverses maladies associées à l'inflammation et la douleur. Ces activités sont probablement liées à un mécanisme de synergie des composants bioactifs.

Les résultats ne sont certes pas concluants, il serait intéressant de mener des études plus approfondies sur les constituants de l'HE et l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* L. démontrant ces activités thérapeutiques, en vue d'identifier l'espèce chimique ou les composés responsables de ces activités.

À l'avenir, il serait intéressant d'exploiter l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel pharmacologique, puisque les hydrolats font l'objet de très peu d'études et peuvent notamment constituer un créneau de recherche intéressant.

Des recherches complémentaires pourraient être intéressantes sur l'exploitation de l'acide rosmarinique et l'analyse de son potentiel pharmacologique, puisque plusieurs études ont montré que l'acide rosmarinique, isolé uniquement de *Melissa officinalis* L. et *Rosmarinus officinalis* semble être une substance très intéressante car elle a non seulement plusieurs activités thérapeutiques, de plus, sa non-toxicité a été déjà prouvée.

La littérature scientifique n'a rapporté aucun effet secondaire, ni aucune toxicité de la mélisse, à ce jour. Cependant, pour confirmer ce concept, il s'avère nécessaire de réaliser une étude de la toxicité avec un test performant.

A l'issue de ce travail, nous pouvons dire que l'espèce *Melissa officinalis* L. a un bon potentiel thérapeutique, ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche.

APPENDICES

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRIVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

OMS : Organisation mondiale de la Santé

CG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HE : Huile essentielle

Ext Méth : Extrait méthanolique ou concrète polaire

MP : Microscope photonique

GX : Grossissement

C.T. : Coupe transversal

Ø : Diamètre de la Zone d'inhibition

Ac : acide

MG : matière grasse

°C : Degrés Celsius

DO : densité optique

g : gramme

cm : centimètre

mm : millimètre

mn : minute

ml : millilitre

µl : microlitre

µg : microgramme

nm : nanomètre

UV-vis : Ultra violet- visible

APPENDICE B
INSTRUMENTS, APPAREILLAGES ET REACTIFS UTILISES

B1/ Appareillage

<u>Appareillages</u>	
Microscope photonique	Microtome
Broyeur mécanique	Balance de précision
Plaque chauffante	Chauffe ballon
Autoclave	Bain marie
Evaporateur rotatif	Hotte chimique aspirante
Etuve bactériologique	Bec benzène
Loupe binoculaire	Réfrigérateur
Densimètre	Karl Fischer
Refractomètre	Extracteur Soxhlet
Spectrophotomètre UV – Vis	Chromatographe phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse

B2/ Verrerie, consommables et réactifs

Verrerie et consommables		
Béchers	Erlène Meyer	Entonnoirs
Ballon à fond plat à col rodé	Ballon sans fond	Cassette
Ampoules à décanter	Micropipette	Porte lame
Pipettes graduées	Pinces	Lames en verre et lamelles
Tube à essai	Portoirs	Moule
Anse de platine	Ecouvillons stériles	Fiole conique
Boite de Pétri	Disques d'antibiogramme stériles	Eprouvette en verre gradué
Pipettes Pasteurs	Burettes	Ciseaux
Seringue	Sonde de gavage	
Solutions, réactifs et indicateurs utilisés		
Ether diéthylique	Méthanol	Carmin aluné
Ether de pétrole	Ethanol 95°	Rouge de Congo
Butanol	Acide acétique	Vert de méthyl
Acétate d'éthyl	Chloroforme	Phénol phtaléine
Acide ascorbique	Acide Chlorhydrique	Paraffine
Formol	Toluène	Hydroxyde de potassium
Gélatine	KOH alcoolique	Thiosulfate de sodium
Spasfon	Diclofenac	Carraghénine
Eau physiologique/ distillée	Eau de javel (12°)	DPPH
Muller-Hinton	Gélose de Sabouraud	

B3/ PHOTOS DE QUELQUES TESTS BIOLOGIQUES



Figure 1 : Gavage des souris



Figure 2 : Injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris



Figure 3 : Injection de l'acide acétique

APPENDICE C

RECHERCHE ETHNOBOTANIQUE

Questionnaire N° : 1

Age, Sexe, Région, Fonction
Région de la récolte de la plante
Période de récolte
Partie utilisée
Nature du traitement pour lequel est administrée la plante
Mode d'emploi
Nature du résultat : + ou -
Effets secondaires

Questionnaire N°2

- Sexe : الجنس :
Age : العمر :
Région : المنطقة :
Fonction : المهنة :
- 1- Connaissez-vous la phytothérapie ? 1- هل تعرفون الطب التقليدي (التداوي بالأعشاب) ؟
 Oui . نعم .
 Non . لا .
- 2- Si oui, comment vous la connaissez ? 2- إذا كان نعم، كيف تعرفونه ؟
 Avez-vous entendu parler . هل سمعتم به ؟
 Avez-vous été déjà soigné par la phytothérapie ? . هل تداويتم بالأعشاب الطبية من قبل ؟
- 3- Connaissez-vous la mélisse ? 3- هل تعرفون هذه النبتة: الترنجان أو فرزيزوة أو مرزيزو ؟
 Oui . نعم .
 Non . لا .
- 4- Comment la connaissez-vous ? 4- إذا كان نعم، كيف تعرفونها ؟
 Utilisé par une personne de votre entourage ? . هل استعملها شخص من معارفك ؟
 Utilisé par vous-même . هل استعملتموها شخصيا ؟
. Entendu parler . هل سمعتم فقط بها ؟
- 5- Dans quelles maladies est –elle utilisée ? 5- في أي مرض أو حالة تستعمل ؟
- 6- Quelle est la partie utilisée de la plante ? 6- ما هو الجزء المستعمل ؟
 La tige . الساق .
 Les feuilles . الأوراق .
. Les fleurs . الأزهار .
. La plante entière . النبتة كاملة .
- 7- Son mode d'utilisation 7- طريقة استعمالها (كيف تناولتها) ؟
- 8- Est ce que le résultat est positif ? 8- هل كانت النتائج إيجابية ؟
 Oui . نعم .
 Non . لا .
. Inconnu . مجهولة .
- 9- Ya t-il des effets secondaires ? 9- هل لها تأثيرات سلبية ؟
 Oui . نعم .
 Non . لا .
. Ignore le résultat . لا تعرف .
- 10- Préférez-vous : 10- ماذا تفضلون ؟
 Un traitement naturel . التداوي بالأعشاب .
 Un traitement médical . التداوي بالطب الحديث .
 Les deux . الإثنين معا .

Tableau : Résultat de l'enquête ethnobotanique avec les spécialistes

Individu	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
1	Herboriste Tizi-Ouzou	Ifer n'tzizoua	+	Lieux ombragés	Avril Mai	Tiges Feuillées	<ul style="list-style-type: none"> - Calmant - Insomnies - La grippe - Crises du colon - En apiculture 	<ul style="list-style-type: none"> - Les tiges feuillées en infusion. - Les feuilles séchées en infusion. - Petite quantité de feuilles en poudre mélangée au miel (usage interne). - Frottement des ruches d'abeilles par les feuilles. - Appliquer les feuilles contre les piqûres d'insectes. 	+	+
2	Herboriste Alger	Mélicse	+	Alger	Mars	Tiges Feuillées	<ul style="list-style-type: none"> - Calmant - La grippe 	<ul style="list-style-type: none"> - Les tiges feuillées en infusion. 	+	+
3	Herboriste Tipaza - Koléa	Mélicse Ferzizoua Trandjane	+	Lieux ombragés Chréa	Avril Mai	Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> - Insomnies - La grippe - Crises du colon - En apiculture - En cuisson 	<ul style="list-style-type: none"> - Les feuilles séchées en infusion. - Frottement des ruches d'abeilles par les feuilles. - Rajout des feuilles fraîches aux salades. 	+	+
4	Herboriste Tipaza - Koléa	Mélicse Ferzizoua	+	Lieux ombragés	Mars Avril	Tiges Feuillées	<ul style="list-style-type: none"> - Calmant - Insomnies - La grippe 	<ul style="list-style-type: none"> - Les tiges feuillées en infusion. 	+	+

Individu	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
5	Médecin phytothérapeute Blida	Mélicse Ferzizoua	+	Lieux ombragés	Début du printemps	Feuilles	- Calmant - Insomnies	- Les feuilles séchées en infusion.	+	+
6	Médecin phytothérapeute Blida	Mélicse Ifer n'tzizoua	+	Lieux ombragés	Début du printemps	Plante entière	- Calmant - Insomnies - La grippe	- Les tiges feuillées en infusion. - Les feuilles séchées en infusion.	+	+
7	Herboriste Blida	Mélicse Ferzizoua Trandjane	+	Hammame Melouane	Le 2 ^{ème} trimestre de l'année	Feuilles	- Calmant - Insomnies - La grippe - Douleur d'estomac	- Les feuilles séchées en infusion. - Petite quantité de feuilles en poudre mélangée au miel (usage interne).	+	+
8	Herboriste Blida	Mélicse Ifer n'tzizoua	+	Bouarfa	Mars Avril	Feuilles	- Calmant - Insomnies - Crises du colon - En apiculture - En cuisson	- Les feuilles séchées en infusion. - Frottement des ruches d'abeilles par les feuilles. - Rajout des feuilles fraiches aux salades.	+	+
9	Herboriste Blida	Ferzizoua Trandjane	+	Hammame Melouane	Mai Juin	Tiges feuillées	- Calmant - Insomnies	- Les tiges feuillées en infusion. - Les feuilles séchées en infusion.	+	+
10	Herboriste Blida	Ferzizoua Trandjane	+	Chrèa Hammame Melouane	Mars	Feuilles	- Calmant - Insomnies - La grippe - En apiculture	- Les feuilles séchées en infusion. - Frottement des ruches d'abeilles par les feuilles.	+	+

APPENDICE D

REALISATION DES COUPES HISTO-ANATOMIQUES

* Réalisation de coupes histologiques

1°. Prélèvement et préparation des échantillons

Quelques rameaux feuillés sont soigneusement nettoyés à l'eau courante et bien égouttés sur du papier buvard. Les organes étudiés sont : les tiges, les feuilles et les pétioles.

2°. La fixation:

Dans des piluliers, les prélèvements sont immédiatement fixés dans une solution FAA pendant 48 h. La fixation permet de garder les structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

3°. La déshydratation:

Elle consiste à extraire l'eau et le fixateur du tissu par passage successif dans cinq bains d'alcool éthylique à titrage croissant, allant de 70° à 100° pendant 1h30 chacun

4°. La désalcoolisation:

Toluène + éthanol (v/v).....	30 minutes
Toluène pur.....	30 minutes
Toluène pur.....	30 minutes
Toluène pur.....	01 heure
Toluène + paraffine (v/v).....	30 minutes
Paraffine.....	01 heure
Paraffine.....	01 heure
Paraffine.....	12 heures

5°. L'inclusion:

La paraffine est coulée à chaud, dans des moules métalliques associés à des cassettes en plastique. L'explant est rapidement plongé avec une pince préalablement chauffée, tout en l'orientant dans le sens de la coupe désirée. La polymérisation de la paraffine à température ambiante permet l'obtention de blocs prêts à être coupés.

6°. La confection et l'étalement des coupes:

Avant de passer à la confection des coupes, les blocs démoulés sont taillés à l'aide d'un scalpel jusqu'à l'apparition des organes inclus. La réalisation des coupes est faite à l'aide d'un microtome, en réglant l'épaisseur à 5µm. Les rubans obtenus sont placés sur des lames. L'étalement se fait avec de l'eau gélatineuse filtrée (5%) puis étalés soigneusement.

Ils sont ensuite traités à l'étuve pour faire dissoudre la paraffine.

7°. Le déparaffinage et l'hydratation:

Toluène pur 15 à 20 minutes à 50°C
Toluène pur 10 minutes
Toluène pur 10 minutes
Alcool absolu 10 minutes
Alcool absolu 10 minutes
Alcool absolu 10 minutes
Alcool absolu + formol (4v/1v) 05 minutes
Rinçage à l'eau courante 10 minutes

Les coupes sont ensuite placées dans des paniers porte-lames et laissées à la température du laboratoire pour sécher.

APPENDICE E

RESULTATS DU BALAYAGE SPECTRAL

Tableau 1: Longueur d'ondes d'absorption des composés détectés au niveau de la fraction polaire de *Melissa officinalis* L.

N°	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
1	283	0,973
2	310	0,952
3	402	0,745
4	671	0,176

Tableau 2: Longueur d'ondes d'absorption des composés détectés au niveau de la fraction apolaire de *Melissa officinalis* L.

N°	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
1	250	1,325
2	305	1,709
3	415	2,233
4	483	0,456
5	505	0,340
6	545	0,142
7	670	0,510

APPENDICE F

RESULTATS DU TEST ANTIOXYDANT

Tableau F.1: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT
a/ À faibles concentrations

C mg/ml		A₀	A_t	A%
0,0025	Essai 1	0,862	0,752	12,761
	Essai 2	0,857	0,754	12,019
	Essai 3	0,859	0,753	12,340
Moyenne		0,859	0,753	12,373
Ecart-type		-	-	0,304
0,005	Essai 1	0,862	0,706	21,462
	Essai 2	0,857	0,709	21,237
	Essai 3	0,859	0,707	21,653
Moyenne		0,859	0,707	21,451
Ecart-type		-	-	0,170
0,010	Essai 1	0,862	0,669	33,295
	Essai 2	0,857	0,662	33,256
	Essai 3	0,859	0,665	33,062
Moyenne		0,859	0,665	33,204
Ecart-type		-	-	0,102
0,025	Essai 1	0,862	0,586	47,680
	Essai 2	0,857	0,589	47,608
	Essai 3	0,859	0,587	47,614
Moyenne		0,859	0,587	47,634
Ecart-type		-	-	0,033
0,050	Essai 1	0,862	0,498	54,872
	Essai 2	0,857	0,501	54,142
	Essai 3	0,859	0,503	54,482
Moyenne		0,859	0,501	54,500
Ecart-type		-	-	0,298
0,100	Essai 1	0,862	0,246	71,462
	Essai 2	0,857	0,250	70,828
	Essai 3	0,859	0,251	70,780
Moyenne		0,859	0,249	71,023
Ecart-type		-	-	0,311

Tableau F.2: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT
b/ À des concentrations élevées

C mg/ml		A₀	A_t	A%
0,1	Essai 1	0,862	0,246	71,462
	Essai 2	0,857	0,250	70,828
	Essai 3	0,859	0,251	70,780
Moyenne		0,859	0,249	71,023
Ecart-type		-	-	0,311
0,2	Essai 1	0,862	0,170	80,278
	Essai 2	0,857	0,169	80,280
	Essai 3	0,859	0,174	79,744
Moyenne		0,859	0,171	80,101
Ecart-type		-	-	0,252
0,4	Essai 1	0,862	0,144	83,295
	Essai 2	0,857	0,142	83,431
	Essai 3	0,859	0,143	83,353
Moyenne		0,859	0,143	83,360
Ecart-type		-	-	0,056
0,6	Essai 1	0,862	0,110	87,239
	Essai 2	0,857	0,113	86,814
	Essai 3	0,859	0,110	87,194
Moyenne		0,859	0,111	87,082
Ecart-type		-	-	0,191
0,8	Essai 1	0,862	0,096	88,863
	Essai 2	0,857	0,092	89,265
	Essai 3	0,859	0,091	89,406
Moyenne		0,859	0,093	89,178
Ecart-type		-	-	0,251
1	Essai 1	0,862	0,073	91,531
	Essai 2	0,857	0,075	91,249
	Essai 3	0,859	0,077	91,036
Moyenne		0,859	0,075	91,272
Ecart-type		-	-	0,203

Tableau F.3: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le tocophérol

C mg/ml		A₀	A_t	A%
0,1	Essai 1	0,733	0,475	35,198
	Essai 2	0,758	0,499	34,169
	Essai 3	0,732	0,481	34,290
Moyenne		0,741	0,485	34,552
Ecart-type		-	-	0,459
0,2	Essai 1	0,733	0,434	40,791
	Essai 2	0,758	0,429	43,404
	Essai 3	0,732	0,442	39,617
Moyenne		0,741	0,435	41,271
Ecart-type		-	-	1,583
0,4	Essai 1	0,733	0,375	48,840
	Essai 2	0,758	0,376	50,396
	Essai 3	0,732	0,371	49,317
Moyenne		0,741	0,374	49,518
Ecart-type		-	-	0,678
0,6	Essai 1	0,733	0,299	59,209
	Essai 2	0,758	0,308	59,367
	Essai 3	0,732	0,302	58,607
Moyenne		0,741	0,303	59,061
Ecart-type		-	-	0,327
0,8	Essai 1	0,733	0,209	71,487
	Essai 2	0,758	0,213	71,900
	Essai 3	0,732	0,211	71,175
Moyenne		0,741	0,211	71,521
Ecart-type		-	-	0,297
1	Essai 1	0,733	0,109	85,130
	Essai 2	0,758	0,116	84,670
	Essai 3	0,732	0,120	83,607
Moyenne		0,741	0,115	84,469
Ecart-type		-	-	0,638

Tableau F.4: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique

C mg/ml		A₀	A_t	A%
0,0025	Essai 1	0,642	0,554	13,707
	Essai 2	0,658	0,588	10,638
	Essai 3	0,631	0,579	8,241
Moyenne		0,644	0,574	10,862
Ecart-type		0,011	0,014	2,237
0,05	Essai 1	0,642	0,564	12,149
	Essai 2	0,658	0,589	10,486
	Essai 3	0,631	0,563	10,776
Moyenne		0,644	0,572	11,137
Ecart-type		0,011	0,012	0,725
0,010	Essai 1	0,642	0,556	13,396
	Essai 2	0,658	0,542	17,629
	Essai 3	0,631	0,562	10,935
Moyenne		0,644	0,553	13,987
Ecart-type		0,011	0,008	2,764
0,025	Essai 1	0,642	0,496	22,741
	Essai 2	0,658	0,512	22,188
	Essai 3	0,631	0,480	23,930
Moyenne		0,644	0,496	22,953
Ecart-type		0,011	0,013	0,727
0,050	Essai 1	0,642	0,396	38,318
	Essai 2	0,658	0,420	36,170
	Essai 3	0,631	0,403	36,133
Moyenne		0,644	0,406	36,874
Ecart-type		0,011	0,010	1,021
0,100	Essai 1	0,642	0,173	73,053
	Essai 2	0,658	0,144	78,115
	Essai 3	0,631	0,194	69,255
Moyenne		0,644	0,170	73,474
Ecart-type		0,011	0,020	3,629

Tableau F.5: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'HE

C mg/ml		A₀	A_t	A%
0,1	Essai 1	0,648	0,560	13,580
	Essai 2	0,660	0,607	8,030
	Essai 3	0,631	0,554	12,203
Moyenne		0,646	0,574	11,271
Ecart-type		0,012	0,024	2,360
0,2	Essai 1	0,648	0,476	26,543
	Essai 2	0,660	0,507	23,182
	Essai 3	0,631	0,502	20,444
Moyenne		0,646	0,495	23,390
Ecart-type		0,012	0,014	2,494
0,4	Essai 1	0,648	0,396	38,889
	Essai 2	0,660	0,427	35,303
	Essai 3	0,631	0,426	32,488
Moyenne		0,646	0,416	35,560
Ecart-type		0,012	0,014	2,619
0,6	Essai 1	0,648	0,324	50,000
	Essai 2	0,660	0,325	50,758
	Essai 3	0,631	0,320	49,287
Moyenne		0,646	0,323	50,015
Ecart-type		0,012	0,002	0,601
0,1930,8	Essai 1	0,648	0,246	62,037
	Essai 2	0,660	0,233	64,697
	Essai 3	0,631	0,232	63,233
Moyenne		0,646	0,237	63,322
Ecart-type		0,012	0,006	1,088
1	Essai 1	0,648	0,238	63,272
	Essai 2	0,660	0,200	69,697
	Essai 3	0,631	0,193	69,414
Moyenne		0,646	0,210	67,461
Ecart-type		0,012	0,020	2,964

Tableau F.6: Activité antioxydante (DPPH) de l'huile essentielle, tocophérol et BHT

Concentration en mg/ml	Activité antioxydante en % *		
	Huile essentielle	Contrôles positifs	
		Tocophérol	BHT
0,1	11,271 ± 2,360	34,552 ± 0,459	71,023 ± 0,311
0,2	23,390 ± 2,494	41,271 ± 1,583	80,101 ± 0,252
0,4	35,560 ± 2,619	49,518 ± 0,678	83,360 ± 0,056
0,6	50,015 ± 0,601	59,061 ± 0,327	87,082 ± 0,191
0,8	63,322 ± 1,088	71,521 ± 0,297	89,178 ± 0,251
1	67,461 ± 2,964	84,469 ± 0,638	91,272 ± 0,203

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

Tableau F.7: Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait méthanolique et BHT

Concentration en mg/ml	Activité antioxydante en % *	
	Extrait méthanolique	Contrôle positif
		BHT
0,0025	10,862 ± 2,237	12,373 ± 0,304
0,005	11,137 ± 0,725	21,451 ± 0,170
0,01	13,987 ± 2,764	33,204 ± 0,102
0,025	22,953 ± 0,727	47,634 ± 0,033
0,05	36,874 ± 1,021	54,500 ± 0,298
0,1	73,474 ± 3,629	71,023 ± 0,311

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

Tableau F.8: Les concentrations IC₅₀ et la puissance antioxydante

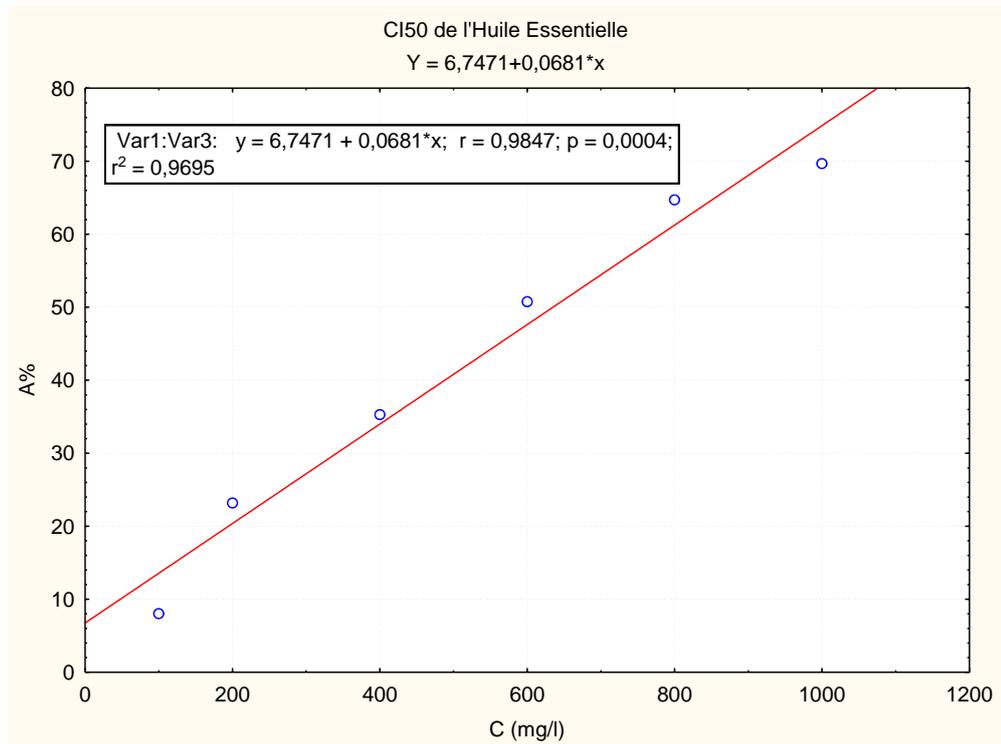
Echantillons	Huile essentielle	Extrait méthanolique	Tocophérol	BHT
IC ₅₀ en (mg/ml) *	0,64 ± 0,01	0,066 ± 0,003	0,391 ± 0,01	0,063 ± 0,0005
ARP en (mg/ml) ⁻¹ *	1,547 ± 0,020	15,103 ± 0,649	2,559 ± 0,067	15,958 ± 0,121

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

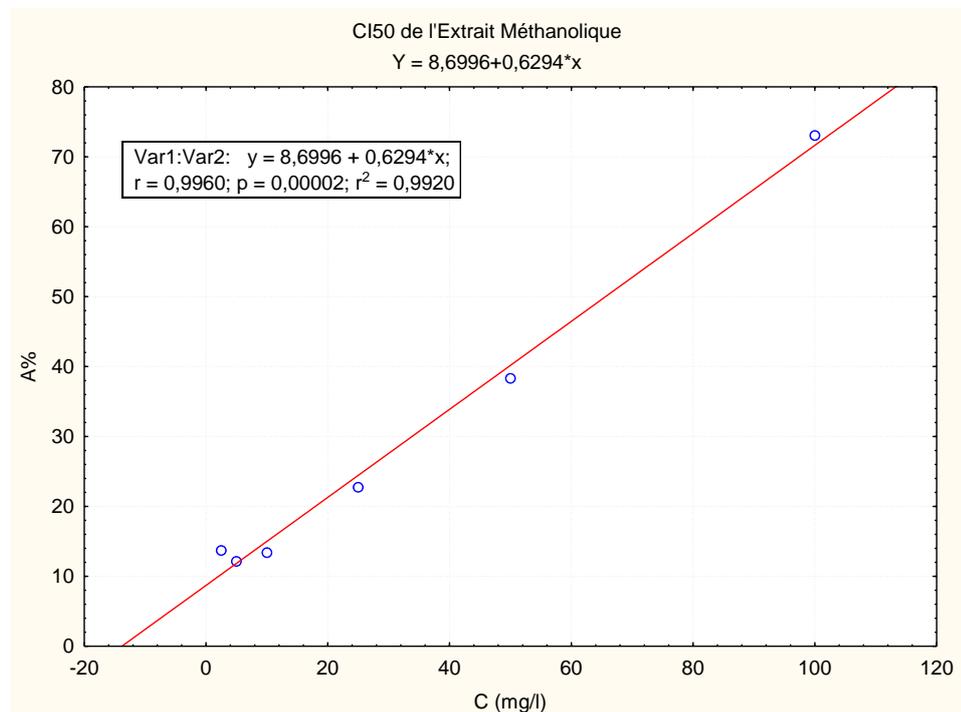
Analyse statistique :

Les courbes des régressions linéaires (STATISTICA.8):

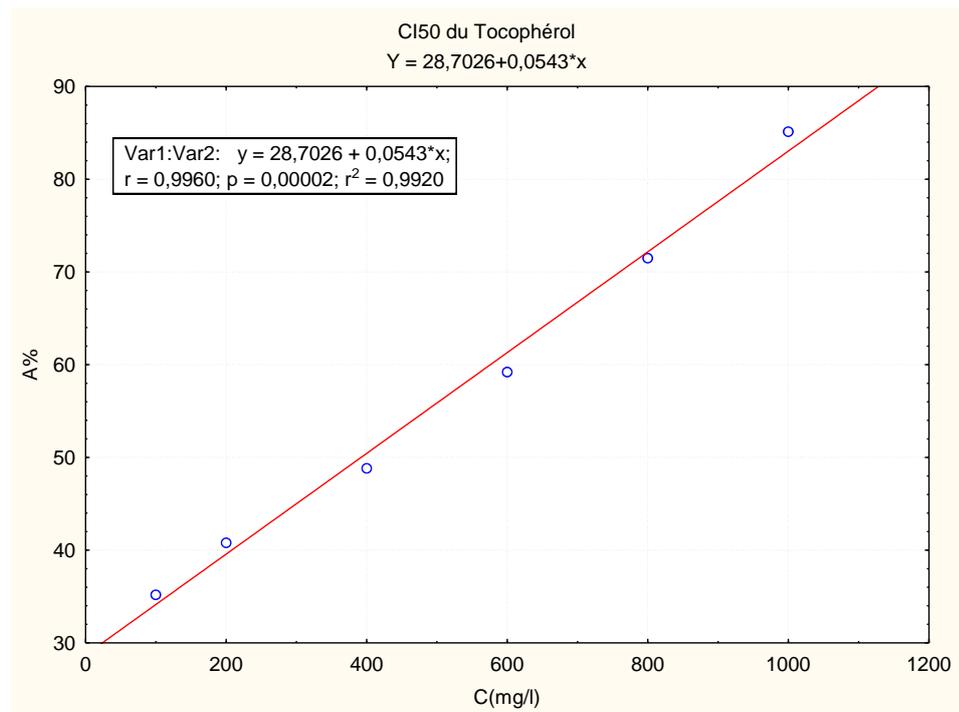
1/ L'Huile essentielle de la mélisse :



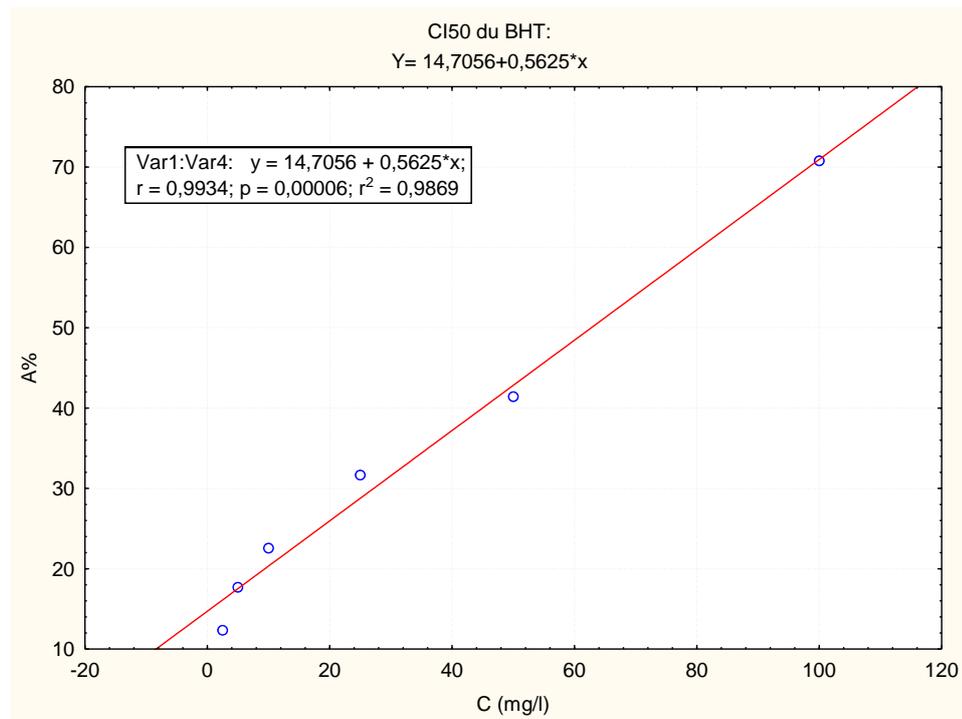
2/ L'extrait méthanolique de la mélisse :



3/ Le tocophérol :



3/ Le B.H.T :



**Test d'ANOVA à sens unique suivi par le test de Tukey de
comparaison par paire au risque de 5%
(Sigma Plot, Version 11.0)**

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed (P = 0,425)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,191)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BHT	3	00,06270,0005770,000333			
Tocophérol	3	0 0,391 0,0125	0,00723		
Ext Méth	3	00,06630,00351	0,00203		
HE	3	0 0,646 0,0100	0,00578		

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	30,717	0,239	3538,839	<0,001
Residual	8	80,0005400,0000675			
Total	11	110,717			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
HE vs. BHT	0,584		4123,048	<0,001	Yes
HE vs. Ext Méth	0,580		4122,275	<0,001	Yes
HE vs. Tocophérol	0,255		453,829	<0,001	Yes
Tocophérol vs. BHT	0,328		469,219	<0,001	Yes
Tocophérol vs. Ext Méth	0,325		468,446	<0,001	Yes
Ext Méth vs. BHT	0,00367		40,773	0,945	No

APPENDICE G

RESULTATS DU TEST ANTIMICROBIEN

Tableau: Activité antimicrobienne de la mélisse à travers le diamètre des zones d'inhibition

Microorganismes	Diamètres des zones d'inhibition* (mm)			
	Extraits de la mélisse		Ciprofloxacine (5 µg/disque)	Amphotéricine B (10 µg/disque)
	HE	Ext Méth		
Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	16,33 ± 0,47	0	31,33 ± 0,94	Non applicable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37,17 ± 0,62	0	38,33 ± 1,70	
Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,17 ± 0,62	0	35,00 ± 0,82	Non applicable
<i>Bacillus subtilis</i>	19,00 ± 0,82	0	14,67 ± 0,47	
Levure				
<i>Candida albicans</i>	45,17 ± 0,24	13,17 ± 0,85	Non applicable	16,00 ± 1,41

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

APPENDICE H

RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Tableau: Résultats du poids des pattes postérieures gauches et droites.

	L'eau physiologique		Clofenal de sodium 12,5mg		lot essai 0,1g/ml		lot essai 0,01g/ml	
	PPD	PPG	PPD	PPG	PPD	PPG	PPD	PPG
Souris n°1	0,139	0,144	0,137	0,155	0,138	0,144	0,136	0,145
Souris n°2	0,139	0,154	0,139	0,151	0,134	0,142	0,138	0,149
Souris n°3	0,144	0,183	0,135	0,149	0,136	0,155	0,140	0,175
Souris n°4	0,135	0,190	0,139	0,153	0,135	0,139	0,137	0,18
Souris n°5	0,144	0,190	0,135	0,159	0,134	0,159	0,136	0,17
Souris n°6	0,139	0,144	0,138	0,147	0,130	0,139	0,136	0,164
Moyenne	0,140	0,168	0,137	0,152	0,135	0,146	0,137	0,164
Ecart-type	0,003	0,021	0,002	0,004	0,002	0,008	0,001	0,013
% d'oedème	19,643		11,057		8,798		19,441	
% de réduction	/		43,709		55,210		1,027	

Analyse statistique :

Test d'ANOVA à sens unique suivi par le test de Student-Newman-Keuls de comparaison par paire au risque de 5% (SigmaPlot- Version 11.0)

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed (P = 0,301)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,112)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Eau physiologique	6	0	19,645	2,601	1,062
Clofénal	6	0	11,058	1,336	0,545
HE 1	6	0	8,791	1,652	0,675
HE 2	6	0	19,489	5,502	2,246

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	573,367	191,122	18,401	<0,001
Residual	20	207,731	10,387		
Total	23	781,098			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Eau physiologique vs. HE 1	10,855	48,250	<0,001		Yes
Eau physiologique vs. Clofénal	8,587	36,527	<0,001		Yes
Eau physiologique vs. HE 2	0,157	20,119	0,934		No
HE 2 vs. HE 1	10,698	38,131	<0,001		Yes
HE 2 vs. Clofénal	8,430	26,408	<0,001		Yes
Clofénal vs. HE 1	2,267	21,723	0,237		No

APPENDICE I

RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTISPASMODIQUE

Tableau: Résultats de l'activité antispasmodique

	Nbr de spasmes: Lot Témoin	Nbr de spasmes: Lot Témoin positif	Nbr de spasmes: Lot essai 1	Nbr de spasmes: Lot essai 2
Souris N°1	30	3	7	10
Souris N°2	20	4	8	9
Souris N°3	35	6	6	12
Souris N°4	25	2	3	9
Souris N°5	16	5	6	10
Souris N°6	25	4	6	10
Nombre globale de spasmes	151	24	36	60
Moyenne	25,2	4	6	10
Ecart-type	6,20	1,29	1,53	1,00
% de protection	/	84,106	76,159	60,265

Analyse statistique :

Test d'ANOVA à sens unique suivi par le test de Student-Newman-Keuls de comparaison par paire au risque de 5% (SigmaPlot- Version 11.0)

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Témoin -6	6	0	25,000	20,000	30,000
Spasfon	6	0	4,000	3,000	5,000
HE 1	6	0	6,000	6,000	7,000
HE 2	6	0	10,000	9,000	10,000

H = 20,561 with 3 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
Témoin - vs Spasfon	102,000	5,889	Yes
Témoin - vs HE 1	78,000	5,965	Yes
Témoin - vs HE 2	36,000	4,076	Yes
HE 2 vs Spasfon	66,000	5,047	Yes
HE 2 vs HE 1	42,000	4,756	Yes
HE 1 vs Spasfon	24,000	2,717	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Iserin. P., Masson. M., Restellini. J-P., Ybert. E., De La Roque. R., Vican. P. & Ybert. E., “ Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins ”, Larousse / VUEF, Paris, (2001), 335 p, pp : 8- 143.
2. Zhiri, A. et Baudoux, D., “ Huiles essentielles chémotypées et leur synergies ”, Edition Inspir Development, Luxembourg, (2005), 80p.
3. Boullard. B., “ Plantes Médicinales du monde réalités et croyances ”, édition Estem, (2001), PP.660.
4. Teuscher, E., Anton R. et Lobstein A., “ Les plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles ”, Lavoisier, technique et documentation, (2005), 519 P, 3 – 480.
5. Anonyme, “ Plantes et médicaments Semences la lettre gnis.”, Bulletin de l’institut biotechnologique des plantes. Conseil national de recherches. Canada, IBP.CNRC. Numéro 01. (Avril 2003).
6. Aït Youssef M., “ Plantes médicinales de Kabylie ”, Editions Ibis Press, Paris, (2006), 349p.
7. Andreas, B., “ Guide des plantes du bassin méditerranéen ”, édition Française, Les éditions Eugen Ulmer, (1998), 400p.
8. Delaveau, P., Lorrain, M., Mortier, F., Rivolier, C., Rivolier, J., Schweitzer, R., “Secrets et vertus des plantes médicinales ”, Selection du Reader’s Digest, 2^{ème} Edition, (1977).
9. Grünwald J. et Jänicke C., “ Le guide de la phytothérapie ”, Edition Marabout, (2006), 416p.

10. Wichtl, M. et Anton, R., “ Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique ”, 2^{ème} édition, Lavoisier, (2003), 692p.
11. Bahtiyarca Bagdat R. et Cosge B., “The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields”, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, (2006), 21 (1), p. 116-121.
12. Delille L., “ Les plantes médicinales d'Algérie ”, Berti éditions, Alger, (2007), 240p.
13. Naghibi. F., Mosaddegh. M., Mohammadi Motamed. S. & Ghorbani. A., “Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology”, Iran, *J. Pharm. Res.*, (2005), 2, 63-79.
14. Couplan. F., “ Dictionnaire étymologie de botanique”, Nestlé (Ed). Luisane, Paris, (2000).
15. Braüchler. C., Meimberg. H., Heubl. G., “Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) - Taxonomy, biogeography and conflicts”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (2010), 55, 501-523.
16. Quezel. P. et Santa. S., “ Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ”, Edition Centre National de la Recherche Scientifique, France, Paris, Tome 2, 7^e édition, (1963), 595 p.
17. Fennane. M., “Grande encyclopédie du Maroc : Flore et végétation”. Ed. Grupp. Walk. Over Italie, G.E.M. Rabat, (1987)114-116.
18. Pistrick. K., “Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the family's Umbelliferae and Labiatae”, *Genetic Resources and Crop EVolution*, (2002), 49: 211-225.
19. Chadeaud. M., Emberger. L., “Traité de Botanique systématique, tome II : les végétaux vasculaires ”, fasc. I et II. Masson, Paris, (1960),1539 pp. 7.
20. Kulišić. T., Dragovic-Uzelac. V., Miloš. M., “Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme”. *Food Technology and Biotechnology*. (2006), 44, 485-492.

21. Taskova. R., Mitova. M., Evstatieva. L., Ancev M., Peev D., Handjieva N., Bankova V., Popov S., "Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae and Rubiaceae". *Boccone*. (1997), 5, 631-636.
22. Sari A. O. et Ceylan A., "Yield Characteristics and Essential Oil Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Grown in the Aegean Region of Turkey ", *Turk J Agric For*, (2002), 26 - p. 217-224.
23. Carnat A. P., Carnat A., Fraise D. et Lamaison J. L., "The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea ", *Pharm Acta Helv*, (1998), 72 - p. 301-305.
24. Perrot. E. et PARIS R., " Les plantes médicinales", Tome 2. France : Presses Universitaires de France, (1971), 117 p.
25. Dupont F., Guignard J.L., " Botanique : systématique moléculaire ". Edition Masson, 1ère édition, (2007), 285 p.
26. Meyer S., Reeb C. et Bosdeveix R., " Botanique : Biologie et physiologie végétales ", 2ème édition, Paris : Editions Maloine, (2008), 490 p.
27. Thoby C., "La mélisse officinale, *Melissa officinalis* L. ", Thèse d'exercice : Pharmacie, Université de Nantes, (2009), n°18 - 136 p.
28. Padrini. F. et Lucheroni. M.T., " Le grand livre des huiles essentielles ", Editions De Vecchi S.A., Paris, (2003), dépôt légal : Avril 2006, 206p.
29. Delaveau, P., " Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques ", Edition Louis Pariente, (2001).
30. Anne-Sophie et Nogaret-Ehrhart, " La phytothérapie – se soigner par les plantes ", Edition Groupe Eyrolles, (2003), Deuxième tirage 2006, 191p.
31. Beloued. A., " Plantes médicinales d'Algérie ", Edition office des publications universitaires, (09-2005), 284p.

32. Girre L., “ Les plantes et les médicaments: l’origine végétale de nos médicaments ”, édition Delachaux et Niestlé S.A., Paris, (2001), Dépôt légal : Mars 2006, 253p.
33. Arnal-Schnebelen. B. et *all*, “ Santé Référence Phytothérapie: La santé par les plantes ”, Edition Sélection du Reader’s Digest, S.A., Paris, (2007), 447p.
34. Spichigher, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. et Jeanmonod, D., “ Botanique systématique des plantes à fleurs ”, Edition presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2^eédition (2002), 413 p.
35. McClintock, D. et Fitter, R.S.R., “ Les guides du naturaliste – Guide des plantes à fleurs de l’Europe occidentale ”, Delachaux et Niestlé S.A., Neuchâtel Switzerland, (1964), 325 p.
36. Boullard, B., “ Dictionnaire: Plantes & champignons ”, Editions ESTEM, (1997), 875p.
37. Podlech, D., “ Gros plan – Les plantes de santé ”, (1988), 257p.
38. Genders, R., Hazelton, N.S., et Wolfert, P., “ Herbes et épices – Botaniques et technologie ”, Edition Berger-Levrault, (Septembre 1982), 191p.
39. Barnes, J., Anderson, L.A. et Phillipson, J.D., “ Herbal Medicines ”, Third edition, Edition pharmaceutical press, (2007), 710 p.
40. Gotez. P., Ghedira. K., “Phytothérapie anti infectieuse”, Edition Springing, (2012), p305.
41. Hayon, “Les plantes médicinales qui nous soignent tradition et thérapeutique”, Edition Ouest France, (2007), p 22, 23.
42. Sari A. O. et Ceylan A., “Yield Characteristics and Essential Oil Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Grown in the Aegean Region of Turkey”, Turk J Agric For, (2002), 26 - p. 217-224.
43. Toth. J., Mrlinova. M., Tekelova. D. & Korenova. M., “Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa Offcinalis* L.)”, Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, (2003), 50, 139-146.

44. Dastmalchi. K., Damien. Dorman. H.J., Oinonen. P.P., Darwis. Y., Laakso. I. and Hiltunen. R., "Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract", *LWT*, (2008), 41, 391 - 400.
45. Burrows, I., "La nature comestible", Edition française Delachaux et Niestlé, Paris, (2005), 144 p.
46. Hmamouchi M., "Les Plantes médicinales et aromatiques Marocaines : Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie", Imprimerie de Fédala, Mohammedia, Maroc, (1999), 389 pp.
47. Baba Aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb", copyright librairie, Alger, (1999), 368 p.
48. Thurzova, L., "Les plantes – santé qui poussent autour de nous", Edition Bordas, (1981), imprimé en Mars 1985, 268 p.
49. Gilly, G., "Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à grasse : Botanique – Culture – Chimie - Production et marché", Edition L'Harmattan, France, (2005), Dépôt légal Juillet 2007, 417p.
50. Nedelec, P.Y., "Larousse du jardin : Toutes les techniques 1000 plantes de A à Z", édition Larousse, (1993), 607p.
51. Cecchini, T., avec la collaboration de Ticli, B., "Encyclopédie des plantes médicinales", Editions De Vecchi S.A., Paris, (2003), 351p.
52. Afnor, "Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles". AFNOR, Paris, (2000), 661-663.
53. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", Tec et doc édition Lavoisier, Paris, 3^{ème} édition, (1999), 1120p.
54. Elabed, D. et Kambouche, N., "Les huiles essentielles", Editions Dar El Gharb, (2003), 91 p.
55. Zhiri A, baudoux D. "Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies". Edition Inspir Development, Luxembourg, (2005), pp: 8-43.

56. Telphon, T., “ ABC des huiles essentielles ”, Editions Grancher, (2003, 2005, imp 2008), 399 p.
57. Huard, D., “ Les huiles essentielles – L'aromathérapie ”, Editions Quebecor, (1999), 197 p.
58. Charpentier, B., Hamon-Lorléac'H, F., Harlay, A., Huard, A. et Ridoux, L., “Guide du préparateur en pharmacie”, Edition Masson, Paris, (1998), 1242 p.
59. Albouy, V., “ Le jardin médicinal, pas à pas : soignez-vous avec les produits de votre jardin ”, Editions de la Lesse, Aix-en-Provence, France, (2008), 95p.
60. Fintelmann, V. et Weiss, R.F., “ Manuel pratique de phytothérapie ”, Editions Vigot, (2004), 438 p.
61. Khiati M., “Guide des maladies infectieuses et parasitaires”. OPU, Alger, (1998).
62. Garnier Delamare., “ Dictionnaire des termes de médecine”. Editions Maloine, Paris. (1992).
63. Berche P, Gaillard J-L, Simonet M, “ Bactériologie: bactéries des infections humaines”. Médecine-Sciences Flammarion, (1989).
64. Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M., “ Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien”, Doin Editeurs, Paris,(1995).
65. Clark, A.M., “Natural products as source for new drugs”, Pharmacol, V. 13, (1996), 1996 p.
66. Kirby, G.C., “Medicinal plants and the control of protozoal disease , with particular reference to malaria”. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, V. 90, (1996), 605-609.
67. Hostettmann, K. et Marston, A., “Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives”, Phytochem, V. 1, (2002), 275-285.
68. Namiki M., “Antioxidants antimutagens in food”. *Crit. Rev. Food Sci.* (1990), 29: 273-300.

69. Duarte, M.C.T., "Activité antimicrobienne de plantes médicinales et aromatiques utilisées au Brésil", MULTICIÊNCIA, V. 7, (Octobre 2006).
70. Valnet, J., "Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes", Maloine, (1984), 544p.
71. Vigneau, C., "Plantes médicinales : Thérapeutique – Toxicité", Masson, Paris, (1985), 290p.
72. Debillerbeck. V-G., Roques. C., Vanière. P., Marquier. P., "Activité antimicrobienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles", *Revue d'hygiènes*, V. 10, n° 3, (2002), 248-251.
73. Cowman. M. M., "Plant products as antimicrobial agents", *clinical microbiology reviews*, V. 12, n° 4, (October 1999), 564-582.
74. Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J., "Microbiology of Waterborne Diseases". Ed Elsevier Academic Press, (2004), pp71-132.
75. Orscov, F.,and Genus, I., "*Eschirichia*: in Kreig, N.R and Hold, J.G., Bergy's manual of sythematic bacteriology", V1, The Williams and wilkins Co. Baltimor, 5, (1986).
76. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., Dusart, J., "Microbiologie", De Boeck University, (2007), 1164p.
77. Joly, J.G., Ishii, H., Teschke, R., Hasamura, Y., Lieber, C.S., " Effect of chronic alcohol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase and demethylase for aminopyrine and ethylmorphine", *Biochem. Pharmacol*, (1973), 22: 1532-1535.
78. Delarras, C., "Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire", (2007), 248p.
79. Patrick B., Jean L., and Michel S., "Bactériologie : Les bactéries des infections humaines", 1er Ed Médecine Sciences Flammarion, Paris, (1988), pp: 100-108-274.

80. Richard C et Kiredjian M., “ Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucelle*, *Bordetella* ”. 2ème édition. Ed Institut. Pasteur, Paris, (1995), pp: 42-43.
81. Carbonelle, B., “Microbiologie, bactériologie”, Les cahiers d'internat, Indigo, (1985).
82. Hart and Shears, “ Atlas de Poche Microbiologie ”. Médecine. Sciences, Flammarion, Paris, (1997), 313 p.
83. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., “ Introduction à la microbiologie”, Renouveau pédagogique, (2001), 87-183.
84. Sanchez-Moreno. C., “methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems”, *Food Science and Technology International*, (2002), V.8, n°3, 121-137.
85. Marc. Fr., Davin. A., Deglène-Benbrahim. L. et Ferrand C., “ Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments ”, *médecine sciences*, (2004), V.20, n°4,458-463.
86. Huang. D., Ou. B. et Prior. R. L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,(2005), n°53, 1841-1856.
87. Popovici. C., Saykova.I. et Tylkowski. B., “ Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH ”, e-*Revue de génie industriel*, (2009), n° 4.
88. Boyd. B., Ford. C., Koepke. Michael. C., Gray. K., Horn. E, Mc. Analley S. et Mc. Analley B., “Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé ”, *Glyco-Science & Nutrion*, (2003), 4, 7p.
89. Morel Y., et Barouki R., “Repression of gene expression by oxidative stress”, *Biochemical Journal*, (1999), 342(3), 481-496.
90. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *Int J Biochem Cell Biol*, (2007), 39(1), 44-84.

91. Loriol, M. et Hervé, N., “ 100 Conseils de comptoir ”, Editions Porphyre, (2008), 213 p.
92. Cavin, A., “ Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés anti oxydantes et anti radicalaires : *Tinospora crisp*, *Merremia emarginata*, *Orophera enneadra* ”, thèse doctorat, Lausanne, (1999), 243.
93. Causse, C., “ Les secrets de santé des antioxydants ”, Alpen Editions s.a.m, (2005), 95 p.
94. Servais, S., “Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : Effet de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3”, Thèse de doctorat de l’université de Claude Bernard, (2002).
95. Vansant, G., “ Radicaux libres et antioxydants : Principe de base. Symposium Antioxydants et alimentation ”, Institut Danone, (2004).
96. Delattre, J., “ Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques ”, Edition Tec et Doc, (2007).
97. Juhas. S., Bujnakova. D., Rehak. P., Cikos. S., Czikkova. S., Vesela. J., Ilkova. G., Koppel. J., “Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice ”, ACTA VET. BRNO, V.77, (2008), 327–334.
98. Öztürk. A., Özbek. H., “The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil : An animal model of anti-inflammatory activity”, *European Journal of Genetique and Medecin*, V. 2, n° 4, (2005), 159-163.
99. Martini, M-C., “ Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie ”, Lavoisier, (2003), 401p.
100. Lechat P.; Calvo F.; De Crémoux P.; Giroud J-P.; Lagier G.; Lechat Ph.; Rouveix B.; Weber S., “ Les médicaments de l’inflammation ”, in Abrégé de pharmacologie. Masson, Paris, (1990), 288-319.
101. Dieng C., “ Contribution à l’étude de *Khaya senegalensis* (DESR.) A.JUSS (Meliaceae) ”, Thèse pharmacie, Dakar, (1993)10, 109 P.

102. Michot, J. “ Module 8 Immuno-pathologie. Réaction inflammatoire ”, Médecine interne, Edition Vernazobres, 290 pp.
103. Bayes O.M., “Contribution à l'étude de l'activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de *Balanites aegyptiaca* L. (Zygophyllaceae) ”. Thèse pharmacie, Bamako. (1997) 67 p.
104. Revillard H., “ Immunologie”, De Boeck Université, 4ème Edition; (2001), p: 600.
105. Moulin M., “Médicaments anti-inflammatoires”, in : Abrégé de pharmacologie. Masson, Paris, (1998), 332-336.
106. Miossec P., “ Physiopathologie de l'inflammation”, La revue du praticien, (2003), 53, 1-7.
107. Cohen, Y. et Jacquot, C., “ Pharmacologie ”, Elsevier Masson, (2008), 487p.
108. Muster, D., “ Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes ”, Elsevier Masson, (2004), 288 p.
109. Bessard, M., “ Cours de pharmacologie ”, Ed Marketing, Paris, (1985), 523.
110. Dangoumau, J., “ Pharmacologie générale ”, Département Pharmacologie, Université Victor Segalen Bordeaux, (2006), p.547.
111. Stahl-Biskup. E. et Sáez . F. “Thyme : The genus Thymus”, Taylor & Francis, USA and Canada, (2002), 330 p.
112. Lis-Balchin. M., “ Lavender The genus Lavandula ”, Taylor & Francis, London and New York, (2002), 268 p, 124-130.
113. Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W., “Animal models of nociception”, *Pharmacological Reviews*, (2001). 53, 597-652.
114. Serrie, A., Thurel, C., “ Douleur et sida ”, Ellips, (1997), 5p.
115. Cohen, V., Jaquot, C., “Pharmacologie”, Paris, 5, (2001), 19-20.
116. Pieri, F., “Pharmacologie et thérapeutique”, Ellips, (1992), 298p.

117. Gabe M., “ Technique Histologiques”, Edition Masson, (1963), 1113p.
118. Girre L., “ Connaître et reconnaître les plantes médicinales ”, Edition Ouest. France, (1980), 332p.
119. Négué Diarra. M., “ Etude phytochimique d’une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae) ”, Université de BAMAKO, Faculté de Médecine de Pharmacie et D’Odonto-Stomatologie, Mali, Thèse de Doctorat d’état en Pharmacie, (2003), 78 p, 42- 48.
120. Konkonn G., Simaga D., Adjoungoua AL., N'Guessan KE., Zirihi, GN. et Kone BD., “Etude pytochimique de *Mitrgynainermis* (Wild) OKTZE (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique ”, *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, (2006), XIV:73 – 80 pp.
121. Dahon., “ Polarimetric Scattering and SAR Information Retrieval”, EdYa-Qiu Jin, Feng Xu. (2003), 215pp.
122. Pharmacopée URSS. Tome II, 11eme édition, Moscou, (1991), 250p.
123. Guignard, J-L., “ Biochimie végétale ”, Editions Masson, Paris, 2^{ème} édition, (2000), 281p.
124. William. B. J, “The original of the soxhlet extractor ”, *Journal of Chemical Education*, Volume 84, n°12, Canada, (2007), pp1913.
125. Venturini N., “ Contribution chimique a la definition de la qualite : Exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus communis* L.) et de cedrat (*Citrus medica* L.) de Corse”, Chimie organique, Université Pascal Paoli, France, (2012), 244 p.
126. Foungeb, S., Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., Paris, R. R ., “ Sur une Hypericaceae de Madagascar l’*Elialea articulata* Cambess”, Plantes médicinales et Phytothérapie, Tome 3, Paris, (1969), pp 197 - 198.
127. Kamoun, P., “ Appareil et méthode en biochimie et biologie moléculaire”, Edition Flammarion, Paris, (1997).
128. Kamoun, P., “ Appareil et méthode en biochimie”, deuxième édition, Flammarion, Paris, (1977), pp 85-182.

129. Di Benedetto, D., Breuil, P., "Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible", *Techniques de l'Ingénieur*, V 2 : 2795, (2007), pp 2-20.
130. Lucchesi, M.E., " Extraction sans solvant assistée par Micro-ondes, Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ", Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies, Canada, (2005), 143p.
131. Caree, P., " Précis de technologie et de chimie industrielle ", Edition Ballière JB et fils, Tome 3, (1953), 170p.
132. Afnor., "Recueil de normes : Les huiles essentielles", Tome I. Echantillonnage et méthodes d'analyse, AFNOR, Paris, (2000), 440 p.
133. Pharmacopée française, 11eme édition, ANSM, Paris, France, (2012), pp: 55-60.
134. Mendhan J., " Analyse chimique quantitative de Vogel ", édition De Boeck Université, Belgique-(2006) P 496.
135. Talbi. H., Boumaza. A., El-mostafa. K., Talbi. J. & Hilali. A. " Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. Mater". *Environ. Sci.* (2015), 6 (4), 1111-1117.
136. Sanchez Moreno. C., Larrauri. J.A. & Saura Calixto. F., "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols ", *Journal Of The Science Of Food & Agriculture*, (1998), 76(2): 270-276.
137. Hazzit. M., " Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie". Thèse de doctorat en chimie, Faculté de chimie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, (2008), 130p.
138. Molyneux. P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) of estimating antioxidant activity". *Journal of science technology*. V.26, n°2. (2004). 211-219.

139. Touaibia. M. & Chaouch. Z., “ Evaluation de l’effet anti-oxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro ”, *Revue Agrobiologia*, n°04, (2013), 64-71.
140. Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Açar G , Özkan H, Kartal N, Polissiou M, Sökmen A, Şahin F., “In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis*”, *J. Agronomic and food chemistry*, (2006), 51:3958-3965.
141. Fauchere JL. “ Bactériofiches: Techniques en bactériologie clinique ”, Edition marketing SA, (1997), 174p.
142. Rahal K., “Standardisation de l’antibiogramme en médecine humaine à l’Echelle Nationale selon les recommandations de l’OMS ”, 4^{ème} ED, Ministre de la santé, de la population et de la Réforme Hospitalière, (2005).
143. Veličković DT, Randjelović NV, Ristić MS, Veličković AS et Šmelcerović AA. “Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L.”, *J Serb Chem Soc*, (2003), 68:17-24.
144. Ponce A.G., Fritz R., Delvalle C. et Roura S.I., “Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard”, *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologic-LWT-*, (2003), 36:679-684.
145. Berkan T, Ustunes L, Lermioglu F, Ozer A., “Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythracea centarium*”, *Planta Med*, (1991), 57:34–37.
146. Maruyama N, ishibashi H, hu W, morofuji S, inouye S, yamaguchi H, abe S. “Suppression of Carrageenan and Collagen II-Induced Inflammation in Mice by Geranium Oil ”, *Mediators of Inflammation*, Vol (2006), ID 62537, P: 1-7.
147. Rouibi. A. Chabane. D. Saidi. F., Azine. K., “Etude comparative de l’activité antispasmodique de l’extrait aqueux d’*Ajuga Iva* L. et de l’ibuprofène chez les souris ”, *Afrique Science*, 08 (02), (2012), p131-137.

148. H. G. Vogel and W. H. Vogel, eds., "Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays", Springer, Berlin and New York, (1997), pp. 246–350.
149. Bottega S. and Corsi G., "Structure, secretion and possible functions of calyxglandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L.", *Botanical J. Linnean Soc*, (2000), 132: 325–335.
150. Marin M., Koko V., Duletić-Laušević S., Marin P.D., Rančić D. et Dajicstevanovic Z., "Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histo chemistry", *S.African J. Botany*. (2006), 72: 378 – 382.
151. Van den Berg T., Freundl E., Czygan F.-C., "*Melissa officinalis* subsp. *altissima*: characteristics of a possible adulteration of lemon balm", *Pharmazie*, (1997), 52(10) : 802-808.
152. Bounihi. A., "Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées)", Thèse de doctorat national en sciences du médicament. Faculté de médecine et de pharmacie, université Mohammed V, Rabat, (2015), 199p.
153. Paris. R.R. et Moyse. H., " Matière médicale ", Tome III, Editions Masson, (1971), 265-266.
154. Lafont, R., " Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ", (2005).
155. Markham KR., "Techniques of flavonoides identification", Edition CNED, Paris, (1982), 120p.
156. Bouzid. A., "Décomposition des effets de la libéralisation financière : Crises versus croissance ", Tunisie, (2009), 11-12pp.
157. Babulka P., "La mélisse (*Melissa officinalis* L.) ", *Phytothérapie*, (2005) 3 - p. 114-117.
158. Gruenwald J., Brendler T. et Jaenicke C., "Physician's Desk Reference (PDR) for herbal medicines", 4ème édition, Montval : Thompson, (2007), 1026p.

159. Abdelatif F., Boudjella H., Zitouni A., Hassani A., "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves for Algerian *Melissa officinalis* L. ", *EXCLI Journal*, (2014), 13:772- 781pp.
160. Sadraei H., Ghannadi A. & Malekshahi K., "Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions", *Fitoterapia*, (2003), 74 (5), 445-452pp.
161. Adzet T., Ponz R., Wolf E. et Schulte E., "Content and composition of *Melissa officinalis* oil in relation to leaf position and harvest time", *Planta Med.*, (1992), 58: 562- 564 pp.
162. Mrljanova M., Tekel'ova D., Felklova M., Toth J., Musil P. et Grancai D., "Comparison of the quality of *Melissa officinalis* L. cultivar Citra with mellissas of European", (2001).
163. Mrljanova M., Tekel'ova D., Felklova M., Reinöhl V. et Toth J., "The influence of the harvestcutheight on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba* ", (2002).
164. Patora J., Majda T., Gora J. et Klimek B., "Variability in the content and composition of essential oil from lemon balm cultivated in Poland", *J. EndocrinolInvest.*, (2003), 26: 950-955pp.
165. Bardeau F, "La médecine par les fleurs". Editions Robert Laffont, S.A., (1976), 440pp.
166. Filho C.A., Silva C.M., Quadri M.B. and Macedo E.A., "Tracer diffusion coefficients of citral and d-limonene in supercritical carbon dioxide", *Fluid Phase Equilibria*, 204, (2003), 65-73.
167. Xing K., You K., Yin D., Yuan Z. and Mao L., "A simple and efficient approach for synthesis of pseudoionone from citral and acetone catalyzed by powder LiOH-H₂O ", *Catalysis Communications*, 11, (2009), 236–239.
168. Pharmacopée européenne, 4ème edition, Conseil de l'Europe, Strasbourg, (2002), 2060p.

169. Sallé, J.L., "Les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie", Editions Frison-Roche, Paris, (1991), 167p.
170. AFNOR (Association Française de Normalisation), Norme française NF ISO 3063: Huile essentielle d'ylang-ylang *Cananga odorata* (Lamarck). J.D. Hooker et Thomson, Paris, (2005).
171. Koba K., sanda K., raynaud C., mandin D., millet J., chaumont J.P., "Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L., *C. nardus* L. et *C. schoenanthus*", *Journal de Mycologie Médicale*, Vol 13, N° 4, (décembre 2003), pp : 175-180.
172. Kanko C., sawaliho B.E, kone S., koukoua G., N'guessan Y.T., "Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*", *Comptes rendus Chimie*, 7, (2004), 1039–1042.
173. Goetz P., "La phytocosmétologie thérapeutique", Ed. Springer-verlag, Paris, (2007), 257p.
174. Lis-balchin M., "*Geranium and Pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium*", CRC Press, Taylor & Francis, London, (2002), pp: 116-131, 147-165, 184-217.
175. Ronat. N. "La mélisse (*Melissa officinalis* L.)", Thèse de doctorat d'état en pharmacie, Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble, (2001), 99p.
176. Tittel G., Wagner H., Bos R., "Chemical composition of the essential oil from *Melissa*", *Planta medica*, (1982), 46: 91-98.
177. Mulkens A., Kapetanidis I., "Etude de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae)", *Pharma. Acta Helv.*, (1988), 63 : 266-270.
178. Schultze W., Klosa R., Zanglein A., Kubeczka K.-H., "Investigations on the essential leaf oil of Balm". *Planta medica*, (1989), 55:219-220.

179. Shalaby A.S., El-Gengaihi S., Khattab M., "Oil of *Melissa officinalis* L., as affected by storage and herb drying", *J. Essent. Oil Research*, (1995), 7: 667-669.
180. Hose S., Zanglein A., Van Den Berg T., Schultze W., Kubeczka K.-II., Czygan F.-C., "üntogenetic variation of the essential leaf oil of *Melissa ojjicinalis* L. ", *Pharmazie*, (1997), 52(3): 247-253.
181. Schnitzler. P., Schuhmacher. A., Astani. A. & Reichling. J., "*Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpes viruses", *Science Direct. Phytomedecine*, (2008), 15: 734-740.
182. Bounihi Amina, Hajjaj Ghizlane, Alnamer Racha, Cherrah Yahia, and Zellou Amina., "In vivo Potential Anti-inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil", *Advances in Pharmacological Sciences*, (2013), ID 101759-7p.
183. Holla M., Svajdlenka E., Tekel J., Vaverkova S., Havranek E., "Composition of the essential oil from *Melissa officinalis* L. cultivated in Slovak Republic", *J. Essent Oil Res*, (1997);9:481-4.
184. Carnat A.P., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L., "The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis*. L. Subsp. *officinalis*) tea", *Pharma Acta Helv*, (1998); 72:301-5.
185. Pino J.A., Rosado A., Fuentes V., "Composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. from Cuba", *J. Essent Oil Res*, (1999), 11:363-4.
186. Dukic N.M., Bozin B., Sokovic M., Simin N., "Antimicrobial and antioxidant activities of (Lamiaceae) essential oil", *J. Agric Food Chem*, (2004), 52:2485-9.
187. Da Silva S.S., Salgueiro Lage A.C.L., Da Silva San Gil R.A., De Almeida Azevedo D., Esquibel M.A.J., "Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. In vitro produced under the influence of growth regulators", *Braz Chem Soc*, (2005), 16:1387-90.
188. Damien Dorman H.J., Surai P., Deans S.G., "In vitro antioxidant activity of plant essential oils and phytoconstituents", *J. Essent Oil Res*, (2000);12:241-8.

189. Allahverdiyev A., Duran N., Ozguven M., Koltas S., "Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2". *Phytomedicine*, (2004), 11:657-61.
190. Basta A., Tzakou O., Couladi M., "Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* from Greece", *Flav Fragr J*, (2005), 20:642-4.
191. LAIB. I. & BARKAT. M., "Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* ", *Agriculture N° 2*, (2011), 89-101.
192. Rombi. M., "100 plantes médicinales : composition, mode d'action et intérêt thérapeutique", Ed. Romart, (1991), 183-185.
193. Ghelardini. C., Galeotti. N., Di Cesare Mannelli L., Mazzanti. G. & Bartolini. A., "Local anaesthetic activity of β -caryophyllene", *Il Farmaco*, 56: (2001), 387–389.
194. Skold. M., Karlberg. A.-T., Matura. M. & Borje. A., "The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization", *Food and Chemical Toxicology*, (2006), 44 538–545.
195. Fernandes. E. S., Passos. G. F., Medeiros. R., Da Cunha. F. M., Ferreira. J., Campos. M. M., Pianowski. L. F. & Calixto. J. B., "Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*", *European Journal of Pharmacology*, 569, (2007), 228–236.
196. Michielin. E. M. Z., Rosso. S. R., Franceschi. E., Borges. G. R., Corazza. M. L., Oliveira. J. V. & Ferreira. S. R.S., "High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene", *J. Chem. Thermodynamics*, 41, (2009), 130–137.
197. Ghedadba. N., Bousselsela. H., Hambaba. L., Benbia. S. & Mouloud. Y., "Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L.", *Pharmacognosie. Phytothérapie*. (2014), 12:15-24.

198. De Sousa. AC., Alviano. DS., Blank. AF., Alves. PB., Alviano. CS. & Gattass. CR., "Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities", *J Pharm Pharmacol*, (2004), 56(5):677-81.
199. Tsimogiannis. D.I. & Oreopoulou. V., "Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids", *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, (2004), s 5, 523-528.
200. Kouri. G., Tsimogiannis. D., Bardouki. H. & Oreopoulou. V., "Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (2007), 8, 155-162.
201. Bondet. V., Williams. W.B. & Berset C., "Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method", *Lebensmittel - Wissenschaft and Technologie*, (1997), 30, 609-615.
202. Ruberto. G. & Baratta. M.T., "Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid model systems", *Food Chemistry*. V. 69, (2000), 167–174.
203. Legault. J. & Pichette. A., "Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2007), 59(12): 1643-1647.
204. Ondrejovic M., Kraic F., Benkovicova H., Šilhar S., "Optimisation of antioxidant extraction from lemon balm (*Melissa officinalis*)", *Czech J. Food Sci.*, (2012), 30: 385–393pp.
205. Yanishkieva. N. & Marinova. E., "Antioxidant activity of selected species of the family Lamiacea grown in Bulgaria", *Die Nahrung*, (1995), 39, 5/6, 458 – 463.
206. Herodez. S. S., Hadolinb. M., Skergeta. M. & Knez Zeljko., "Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves", *Food Chemistry*, (2003), 80, 275 – 282.

207. Caniova. A. & Brandsteterova. E., "HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa Officinalis*", *J. Liq. Chrom. & Rel Technol.*, (2001), 24 (17) 2647 – 2659.
208. Boyadzhiev. L. & Dimitrova. V., "Extraction and Liquid Membrane Preconcentration of Rosmarinic Acid from Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.)", *Separation Science and Technology*, (2006), 41, 877 – 886.
209. Ziakova. A., Brandsteterova. E. & Blahova. E., "Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*", *Journal of Chromatography A*, (2003), 983, 271 – 275.
210. Mencherini T., Picerno P., Scesa C. et Aquino R., "riterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*", *T - J Nat Prod*, (2007), 70 - p. 1889-1894.
211. Kelly E.H., Anthony R.T. and Dennis J.B., "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships", *Journal of Nutritional Biochemistry*, (2002), 13, 572-584.
212. Cosentino S., Tuberoso C.I. Pisano B. Satta M. Mascia V. Arzedi E. Palmas F., "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils ", *Letters in Applied Microbiology*, (1999), 29: 130-135.
213. Poole K., "Multidrug resistance in Gram-negative bacteria", *Current Opinion in Microbiology*, (2001), 4: 500-508.
214. Burt S., "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods", a review. *International Journal of Food Microbiology*, (2004), 94:223-53.
215. Livermore DM., "Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare", *Clinical Infectious Diseases*, (2002), 34(5): 634-640.
216. Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H. M. & Vogenschow H., "Action of terpenoids on energy metabolism: In: Brunke", E.J., Progress in

Essential Oil Research, (1986). 429– 445, 16th International Symposium on Essential Oils. Berlin.

217. Sikkema J., De Bont J.A.M. & Poolman B., “Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes”, *Journal of Biological Chemistry*, (1994), 269: 8022–8028.
218. Oosterhaven K., Poolman B. & Smid E.J., “S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound”, *Industrial Crops and Products*, (1995), 4: 23–31.
219. Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C. Wyllie S.G. & Warmington J.R., “Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*”, *Letters in Applied Microbiology*, (1998), 26: 194–198.
220. Helander I.M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. & Von Wright A., “Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1998), 46: 3590–3595.
221. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. & Wyllie S.G., “The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)”, *Journal of Applied Microbiology*, (2000), 88: 170–175.
222. Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E., “A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol”, *Journal of Applied Microbiology*, (2001), 91: 453–462.
223. Skandamis P.N. & Nychas G.-J.E., “Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres”, *Journal of Applied Microbiology*, (2001), 91: 1011–1022.
224. Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V., “Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by timekill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2002), 46: 1914–1920.

225. Ultee A., Bennink M.H.J. & Moezelaar, R., "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*", *Applied and Environmental Microbiology*, (2002), 68: 1561–1568.
226. Denyer S.P. & Hugo W.B. "Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane: In: Denyer, S.P., Hugo, W.B., Mechanisms of Action of Chemical Biocides", 171– 188. The Society for Applied Bacteriology. Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication. Oxford. (1991).
227. Larrondo J.V., Agut M., Calvo-Torras. M.A., "Antimicrobial activity of essences from labiates", *Microbios*, (1995), 82(332):171-172.
228. Onawunmi. G.O., "Evaluation of the antimicrobial activity of citral", *Lett. Appl. Microbiol.*, 9 (1989), 105-108.
229. Mesa-Arango A. C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Duran C., Betancur-Galvis L. et Stashenko E., "Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, (2009), 104 - p. 878-884.
230. Cushnie T.P.T., Lamb A.J., "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids", *Int J Antimicrob Agents*, (2011), 38: 99-107.
231. Jones W.P., Kinghorn A.D., "Extraction of plant secondary metabolites", *Natural products isolation*, Humana Press –Totowa, (2005), pp: 323-411.
232. Kanyonga P.M, Faouzi M.A, Meddah B, Mpona M, Essassi E.M, Cherrah Y., "Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, (2011), 3: 199-204.
233. Ulukanli Z., Akkaya A., "Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey", *International Journal of Agriculture and Biology*, (2011), 13 : 105-109.
234. Sreenivasa Rao P.P. Sreenivasa R.P. Karmarkar S.M., "Antibacterial activity of species of *Sargassum*", *Botanica Marina*, (1988), 31, 295-298.

235. Arun Kumar K. and Rengasamy R., "Antibacterial activity of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*", *Bit Mar*, (2001), 43, 417-421.
236. Rhayour K., "Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*", Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc, (2002), 158 p.
237. Santos. F. A. and Rao. V. S. N., "Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils," *Phytotherapy Research*, vol. 14, (2000), pp. 240–244.
238. Abe. S., Maruyama. N., Hayama. K. et al., "Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils", *Mediators of Inflammation*, vol. 12, no. 6, (2003), pp. 323–328.
239. Otterness. G., Gans. D.J., "Transtéroïdal anti-inflammatory drugs: an analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling", *J Pharm Sci.*, (1988), 77(9):790-795.
240. Martin-Pares E., "Recherche de l'activité anti-inflammatoire de substances d'origine naturelle", In : Fleurentin J, Cabalion P, Mazars G, Dos Santos J, Younos C. 1er colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs, (23-25/03/1990), Paris Metz . Orstom SFE. Proceeding : (1990), 270-278.
241. Keville K, Green M., "Aromatherapy: a complete guide to the healing art", The Crossing Press, (1995), 156p.
242. Rogerio A. P., Andrade E. L., Leite D. F. P., Figueiredo C. P. et Calixto J. B., "Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation", *Brit J Pharmacol*, (2009), 158 - p. 1074-1087.
243. Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen J. Z., Xie X. Q., Altmann K. H., Karsak M. et Zimmer A., "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid", *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2008), 105, p. 9099-9104.

244. Song, Y., Zhao, H., Liu, J. Fang, C. et Miao, R., "Effects of Citral on Lipopolysaccharide - Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells", *Inflammation*, (2016), 39: 2, 663-671pp.
245. Dudai, N., Weinstein. Y., Krup. M., Rabinski. T. and Ofir. R., "Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines", *Planta Med*, (2005), 71: 484–488.
246. Chaouki. W., Leger. D.Y., Liagre. B., Beneytout. J.L., and Hmamouchi. M., "Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells", *Fundam Clin Pharmacol*, (2009), 23: 549–556.
247. Bachiega. T.F., and Sforcin. J.M., "Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages", *J Ethnopharmacol*, (2011), 137: 909–913.
248. Yang. S.M., Hua. K.F., Lin. Y.C., Chen. A., Chang. J.M., Chao. L.K., Ho. C.L., and Ka. S.M., "Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice", *PLoS One* 8, (2013).
249. Lee. H.J., Jeong. H.S., Kim. D.J., Noh. Y.H., Yuk. D.Y., and Hong. J.T., "Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells", *Arch. Pharm. Res.*, (2008), 31: 342–349.
250. Sforcin. J. M., Amaral. J. T., Fernandes. A. Jr., Sousa. J. P. B., and Bastos. J. K., "Lemongrass effects on IL-1 β and IL-6 production by macrophages", *Natural Product Research*, vol. 23, no. 12, (2009), pp. 1151–1159.
251. Lin. J.C.-T., Chen. C.-J., Lin. T.-Y., Tung. J.C., and Wang. S.-Y., "Antiinflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 18, (2008), pp. 8783–8787.
252. Büchner K.H., Hellings H., Huber M., Peukert E., Späth L., Deininger R., "Doppelblindstudie zum Nachweis der therapeutischen Wirkung von Melisengeist bei psychovegetativen Syndromen", *Med.Klin*, (1974), 69: 1032-1036.

253. Koster, R., Anderson, M., De-Beer, E.J., "Acetic acid for analgesic screening", *Fed Proceed*, (1959), 18, 412–418.
254. Hokanson, G.C., "Acetic acid for analgesic screening", *J Nat Prod*, (1978), 41: 497-498.
255. Chakraborty, A., Devi, R.K.B., Rita, S., Sharatchandra, Kh. et Singh, T.I., "Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models", *Indian J. Pharmacol*, (2004), 36: 148-150.
256. Taesotikul, T., Panthong, A., Kanjanapothi, D., Verpoorte, R. et Scheffer, J.J.C., "Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive activities of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir", *J. Ethnopharmacol*, (2003), 84:31-35.
257. Zhang. C.R., Aldosari. S.A., Vidyasagar. P. et Nair. M.G., "Antioxidant and Antiinflammatory Assays Confirm Bioactive Compounds in Ajwa Date Fruit", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2013), 61(24): 5834–5840.
258. Derardt, R., Jougney, S., Delevacee, F., Falhout, M., "Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition", *Eur J Pharmacol*, (1980), 61, 17-24.
259. Duarte. I.D., Nakamura. M., Ferreira. S.H., " Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice", Brazil, *J.Med. Biol. Res*, (1988), 21 (2): 341-3.
260. Neo. A.G., Costa. G.M.L.C., Belati. A.H.C., Vinholi. A.H.C., Possebon. L.S., Da Silva Filho. A.A., Cunha. W.R., Carvalho. J.C.T., Bastos. J.K., Pedersen. J., *Ethnopharmacol*, 96, (2005), 87-91.
261. Williamson. E.M., Okpako. D.T., Evans. F.J., "Pharmacological Methods in Phytotherapy Research: Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material", John Willey and Sons, England, 1st ed., (1996), 1, 131-184.

262. Perianayagam. JB., Sharma. SK., Joseph. A., Christina. AJ., "Evaluation of anti-pyretic and analgesic activity of *Emblica officinalis* Gaerth", *J. Ethnopharmacol*, (2004), 95: 83-85.
263. Berkenkopf. JW., Weichman. BM., "Production of prostacycline in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenyl benzoquinone and zymosan: its role in writhing response", *Prostag. Leukotr. Ess.*, (1998), 36: 693-709.
264. Vanderlinde. FA., Landim. HF., Costa. EA., Galdino. PM., Maciel. MA., Anjos. GC., Malvar. DC., Côrtes. WS. et Rocha. FF., "Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L.", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2009), 45(3): 437-442.
265. Reanmongkol. W., Noppapan. T. et Subhadhirasakul. S., "Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals", *Journal of natural medicines*, (2009), 63(3):290-296.
266. Ouédraogo. N., Lompo. M., Sawadogo. R., Tibiriet. A., Hay. AE., Koudou. J., Dijoux. MG. et Guissou. IP., "Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae)", *Phytothérapie*, (2012), 10: 286-292.
267. Choi. JH., Jung. BH., Kang. OH., Choi. HJ., Park. PS., Cho. SH., Kim. YC., Sohn. DH., Park. H., Lee. JH. et Kwon. DY., "The anti-inflammatory and antinociceptive effects of ethylacetate fraction of *Cynanchi paniculati Radix*", *Biological & pharmaceutical bulletin*, (2006), 29(5): 971-975.
268. Bruneton, J., "Pharmacognosie - phytochimie, plantes médicinales", 4ème éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, (2009), 1288 p.
269. Tessier, A., "Phytothérapie analytique - Phytochimie et pharmacologie", Editions Marc-Aurèle, France, (1994), pp.175-184.

COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *MELISSA OFFICINALIS* L.

FEKNOUS Souad^{1*}, HAIANI Cherifa¹, CHERIF Hamida¹ et SAIDI Fairouz¹

1. Université de Blida1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Laboratoire de Recherche Biotechnologie, Environnement et Santé, B.P. 270, route de Soumaa, Blida Algérie

Reçu le 21/10/2017, Révisé le 24/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet : Le présent travail consiste à déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de la mélisse (*Melissa officinalis* L.) et évaluer son pouvoir antioxydant.

Objectifs : Cette étude apporte une contribution à la valorisation des plantes aromatiques de la flore algérienne, afin de trouver de nouveaux produits naturels bioactifs et remplacer ainsi les molécules de synthèse toxiques.

Méthodes : L'huile essentielle de la mélisse obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de la plante sèche a été analysée par CG/SM. Le pouvoir antioxydant de cette huile a été évalué par le test de DPPH.

Résultats : L'huile essentielle de la mélisse contient une forte proportion en sesquiterpènes hydrocarbonés (Trans β -Caryophyllène 19,25%). Elle a présenté une activité antiradicalaire avec une $IC_{50}=0,64\pm 0,01$ mg/ml.

Conclusion : L'huile essentielle de la mélisse présente une modeste activité antioxydante. Toutefois, vu la richesse de cette huile en composés très appréciés en pharmacologie, cette contribution ouvre de larges perspectives de recherche.

Mots clés: *Melissa officinalis* ; huile essentielle ; CG/SM ; effet antioxydant

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *MELISSA OFFICINALIS* L. ESSENTIAL OIL

Abstract

Description of the subject: The present work consists in determining the chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. and evaluating its antioxidant power.

Objective: This study contributes to the valorisation of aromatic plants of Algerian flora, in order to find new bioactive natural products and thus replace the toxic synthetic molecules.

Methods: The essential oil of *Melissa* obtained by drifting to the steam of the dry plant was analyzed by GC/MS. The antioxidant power of this oil was evaluated by the DPPH test.

Results: The essential oil of *Melissa* contains a high proportion of hydrocarbon sesquiterpenes (Trans β -Caryophyllene 19,25%). It exhibited an antiradical activity with an $IC_{50}=0,64\pm 0,01$ mg/ml.

Conclusion: The essential oil of *Melissa* has a modest antioxidant activity. However, given the richness of this oil in compounds highly appreciated in pharmacology, this contribution opens wide prospects for research.

Keywords: *Melissa officinalis* ; essential oil ; GC/MS ; antioxidant effect

*Auteur correspondant: FEKNOUS Souad, E-mail: feknous.souad@yahoo.fr

INTRODUCTION

Depuis la période préhistorique, les plantes ont été à la base de plusieurs thérapies. Les médecins et les pharmaciens prescrivaient ou vendaient environ 90% de produits à base de plantes [1].

La préservation et la valorisation des ressources naturelles à intérêt médicinale et aromatique sont devenues des domaines très importants sur le plan économique [2]. De nos jours l'utilisation des plantes en médecine a évolué : les médicaments sont aujourd'hui le fruit d'une recherche longue et coûteuse qui passe de la cueillette au laboratoire, à la détermination du principe actif, son isolation ensuite la synthèse [3]. Cependant, les plantes restent encore sous-exploitées dans le domaine de la recherche de nouveaux antioxydants naturels, surtout que l'utilisation des substituants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels [4]. Ces substances jouent un rôle important en agroalimentaire dans la préservation des aliments et contribuent en médecine à la prévention des maladies chroniques en combattant le stress oxydant [5]. La mélisse « *Melissa officinalis* » est une vieille plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs [6]. Elle est originaire de la région méditerranéenne orientale. La mélisse pousse à l'état spontané dans les pays chauds [7]. C'est une plante commune dans toute l'Algérie, où on la retrouve dans des lieux incultes, ombragés, sur les terrains riches en humus, en marge des forêts et aux bords des chemins jusqu'à 1000 mètre d'altitude ainsi qu'aux alentours des maisons [8].

Elle est aussi largement cultivée dans les régions de la Kabylie néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du Tell. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen [9, 10].

Melissa est une plante vivace de cinquante à soixante-dix centimètres de longueur. Il s'agit d'une plante herbacée robuste qui évolue en touffe, à rhizome court mais portant de nombreux bourgeons adventifs servant à perpétuer et multiplier la plante [11, 12]. Elle est également connue sous le nom de citronnelle car elle dégage une délicate odeur de citron lorsqu'on froisse ses feuilles [13].

La mélisse, malgré des références anciennes, est une nouvelle venue en phytothérapie moderne [14]. Elle est très largement préconisée par les herboristes en Algérie notamment pour son effet calmant.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche et la valorisation des substances naturelles bioactives qui présentent un intérêt dans le domaine de la bio-pharmacologie afin de remplacer les molécules de synthèse toxiques. L'objectif principal de ce travail est de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et d'évaluer *in vitro* son activité antioxydante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

La plante étudiée *Melissa officinalis* L., a été récolté dans la région montagneuse de Hammam Melouane dans la wilaya de Blida (Tableau 1). La récolte a été effectuée sur les parties aériennes au mois de mai 2014, avant la floraison.

Tableau 1: Coordonnées géographiques du site de récolte de *Melissa officinalis*

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude
Hammam Melouane	Blida - Algérie	266 m	36°28'46.06'' Nord	3°02'51.05'' Est

Son identification a été faite au niveau du *Parc National de Chréa* (Direction de Blida) et a été confirmée au laboratoire de biologie végétale du département des Biotechnologies de l'Université de Blida1. Le séchage de la plante a été effectué à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de mélisse a été faite par entraînement à la vapeur d'eau. Il s'agit d'une distillation continue en circuit fermé pendant un temps suffisant pour entraîner la totalité de l'huile essentielle contenue dans la plante. Les vapeurs en traversant la plante font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile. L'huile essentielle est recueillie par simple décantation du distillat.

3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a été effectuée par un appareil de type Hewlett-Packard (6890N) couplé à un spectromètre de masse (HP 5973N) d'Agilent Technologies. La fragmentation est effectuée en mode électron-impact (E.I.) à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm). La température de la colonne est programmée de 70 à 250°C à raison de 4°C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1 ml.min⁻¹. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse et piloté par un logiciel « Turbomass » qui permettra l'identification des constituants aromatiques de l'huile essentielle. La composition en pourcentage a été calculée à partir de la somme des hauteurs de pic de la composition totale de l'huile.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

Mesure de l'activité anti radicalaire (DPPH) : L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par la méthode de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant des produits testés a été comparé à un antioxydant de synthèse (Butyl-hydroxy-toluène : BHT) et un antioxydant naturel (le tocophérol).

-Principe : La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH* (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) [15].

-Mode opératoire : Le test utilisant le DPPH a été réalisé en suivant la méthode décrite par Sanchez-Moreno et al [16, 17], où 50µl de chacune des dilutions des produits testés sont mélangés à 2ml d'une solution méthanolique de 60µM de DPPH (dissoudre 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol). Après une période d'incubation de 30 minutes, à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 517nm. L'activité antioxydante est donnée par le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH (A%) qui est calculé par la formule suivante :

$$A\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{blanc}}] \cdot 100$$

Où:

A_{blanc} : Absorbance du témoin (DPPH) au temps zéro avant addition de l'échantillon à tester.

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé.

Cette décoloration est représentative de la capacité des composés à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances [18].

Le paramètre IC₅₀ a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs. Il est défini comme étant la concentration de l'extrait efficace pour réduire 50 % de DPPH en solution [18]. Cette grandeur est déterminée graphiquement en traçant pour un échantillon donné la courbe A% en fonction de la concentration puis on détermine la concentration qui correspond à A% = 50.

Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire a été calculé nommé « ARP » qui est égale à 1/IC₅₀ [19].

5. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne de trois analyses ± écart-type. L'analyse statistique a été exécutée en utilisant l'analyse de la variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées significatives. Les régressions linéaires ont été obtenues en utilisant le logiciel (STATISTICA 8) et l'analyse statistique et l'importance de la corrélation entre les variables ont été exécutées en utilisant le logiciel (SigmaPlot 11.0).

RÉSULTATS

1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) de la composition chimique de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2: Composés de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*

N°	Temps de rétention (mn)	Composé identifié*	Pourcentage (%)
1	12.48	Citronnellal	1,55
2	15.52	β-Citral (Néral ou citral b)	2,66
3	16.08	(S)-(-)- Acide Citronnelique, Ester méthylique	2,43
4	16.54	α-Citral (Géranial ou citral a)	5,31
5	18.20	Géranate de méthyle	0,66
6	19.89	α-Copaène	5,31
7	20.16	cis-Myrtanol	2,21
8	21.41	Trans β-Caryophyllène	19,25
9	22.37	α-Humulène	5,31
10	23.19	Germacrène D	2,88
11	24.20	γ-Muuroolène	1,33
12	24.47	δ-Cardinène	3,54
13	26.31	Oxyde de caryophyllène	18,58
14	27.04	Oxide de humulène	6,19
15	28.52	Caryophyllenol II (Caryophylla 3,8 (13) dien 5Beta-ol)	10,84
16	28.87	(4S-5R)-5, hydroxycaryophyl-8-(1-3) ene 4,12 époxyde	4,42
17	33.13	Hexahydrofarnesyl acétone (2-penta decanone 6, 10, 14 triméthyl	0,66
18	53.78	Phtalate de dioctyle	6,86
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle			
Monoterpènes			-
Sesquiterpènes			37,62
Esters terpéniques			9,95
Oxydes terpéniques			29,19
Alcools terpéniques			13,05
Aldéhydes terpéniques			9,52
Cétones			0,66
TOTAL			99,99

*Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP-5MS,

Au total 18 composés ont été identifiés. Le profil chromatographique est caractérisé par 3 pics majoritaires, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés, dont on cite : le sesquiterpène : β-caryophyllène (19,25%), l'oxyde terpénique : oxyde de carophyllène (18,58%) et l'alcool terpénique : caryophyllenol II (10,84%). On note la présence des sesquiterpènes suivant : α-copaène et α-humulène avec le même pourcentage (5,31%), δ-cardinène (3,54%), germacrène D (2,88%) et γ-muuroolène (1,33%).

Aussi une présence non négligeable des aldéhydes terpéniques : α-citral (5,31%), β-citral (2,66%) et citronnellal (1,55%). On note la présence des esters terpéniques, alors que les cétones sont minoritaires sous forme de traces.

2. Activité antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante (DPPH), exprimés en pourcentage d'activité anti-radicalaire, de l'huile essentielle de

Melissa officinalis L. ainsi que ceux du tocophérol et du Butyl-hydroxy-toluène (BHT) sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3: Activité antioxydante (DPPH) de l'huile essentielle, tocophérol et BHT

Concentration en mg/ml	Activité antioxydante en % *		
	Huile essentielle	Contrôles positifs	
		Tocophérol	BHT
0,1	11,27 ± 2,36	34,55 ± 0,46	71,02 ± 0,31
0,2	23,39 ± 2,49	41,27 ± 1,58	80,10 ± 0,25
0,4	35,56 ± 2,62	49,52 ± 0,68	83,36 ± 0,06
0,6	50,02 ± 0,60	59,06 ± 0,33	87,08 ± 0,19
0,8	63,32 ± 1,09	71,52 ± 0,30	89,18 ± 0,25
1	67,46 ± 2,96	84,47 ± 0,64	91,27 ± 0,20

* moyenne de trois mesures ± écart-type,

Ces résultats révèlent que tous les substrats testés possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante.

Le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration des substrats.

Pour une concentration élevée de 1mg/ml, il atteint 67,46 % par l'huile essentielle et 84,47% par le tocophérol ainsi qu'une réduction presque totale de l'ordre de 91,27% par le BHT.

Les IC_{50} exprimant la concentration efficace du substrat antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH mises en solution dans le méthanol, ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

La validité de ces régressions est testée par les coefficients de corrélation qui doivent être très

proches de 1,00. Selon Ghedadba *et al.* [20], une valeur plus faible de l' IC_{50} indique une activité antioxydante plus élevée.

Les valeurs des concentrations inhibitrices IC_{50} (Fig. 1) montrent une activité assez importante de l'huile essentielle ($IC_{50} = 0,64 \pm 0,01$ mg/ml) et le tocophérol ($IC_{50} = 0,39 \pm 0,01$ mg/ml) puisqu'ils agissent à des concentrations élevées. Toutefois, le BHT présente une activité antiradicalaire supérieure à 50% quelque soit la concentration utilisée. Par conséquent, le BHT présente un IC_{50} inférieur à 0,1mg/ml.

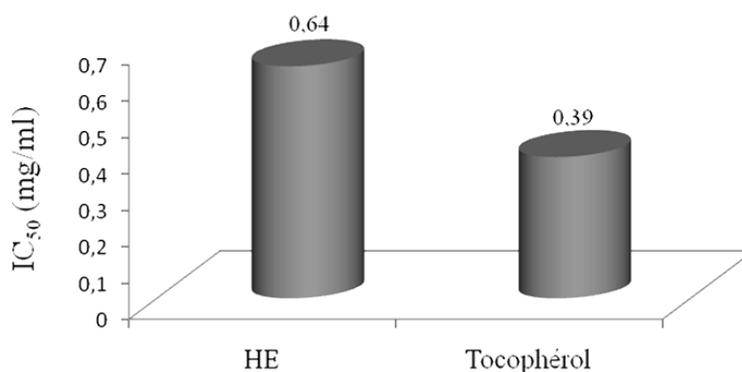


Figure 1 : Concentration inhibitrice à 50% de l'huile essentielle et du tocophérol

L'analyse des valeurs IC_{50} par ANOVA a révélé une différence très hautement significative ($p < 0,001$). Le test post-hoc de Tukey a donné des différences significatives ($p < 0,05$) entre l'huile essentielle et les deux standards. L'activité du BHT est significativement la plus élevée.

En comparant le résultat obtenu avec l'huile essentielle de la mélisse et les standards, on peut classer l'activité et la puissance antioxydante selon l'ordre suivant : BHT > Tocophérol > Huile essentielle (avec des ARP de $2,57 \pm 0,05$ pour tocophérol et $1,55 \pm 0,02$ pour l'huile essentielle).

L'huile essentielle a manifesté un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH mais cette capacité est d'une puissance faible en comparaison avec les contrôles positifs.

DISCUSSION

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* a montré une grande diversité de constituants appartenant à différentes familles de composés chimiques avec une prédominance des sesquiterpènes.

Cependant, selon Ronat [21] les principaux travaux réalisés sur la composition de l'huile essentielle de mélisse émanant de chercheurs allemands, suisses et égyptiens (s'échelonnant de 1982 à 1997) ont obtenu des proportions élevées en monoterpènes.

Nos résultats sont aussi différents de ceux obtenus par Schnitzler *et al.* [22], qui ont examiné la composition chimique de l'huile essentielle de la mélisse d'origine Allemande. Ils ont trouvé une dominance des aldéhydes monoterpéniques.

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de la récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction [23].

Selon Anton et Wichtl [24], la teneur en β -Caryophyllène peut atteindre jusqu'à 28% et au cours de la conservation elle se transforme en époxydes de caryophyllène et germacrène D jusqu'à 15%, ce qui concorde avec nos résultats.

Le caryophyllène (ou β -caryophyllène, ou encore (-)-trans-caryophyllène) est un sesquiterpène bicyclique. Il a un effet anti-inflammatoire et antiallergique et possède une activité analgésique avec des effets gastriques cytoprotectifs. Cela le rend utilisable dans les domaines de la pharmacie et de la médecine [25, 26, 27, 28].

Par ailleurs, nos résultats de l'activité antiradicalaire sont en accord avec ceux de De Sousa *et al.* [29] qui ont confirmé que l'huile essentielle de la mélisse d'origine Brésilienne présente une activité antioxydante par le piégeage du radical DPPH et sont aussi similaires aux résultats de Bounihi [30] qui a montré que l'huile essentielle de la mélisse d'origine Marocaine présente une faible activité antioxydante avec une $IC_{50} = 1,75 \pm 0,03$ mg/ml.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant [31, 32]. Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant [33], ce qui explique la puissance élevée du BHT et du tocophérol par rapport à notre extrait.

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* possède une activité antiradicalaire qui est liée à sa composition chimique, et il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu. Les travaux de Ruberto et Baratta [34] relatifs à l'activité antioxydante de 98 composants chimiques purs des huiles essentielles ont montré que les hydrocarbures terpéniques avaient un effet antiradicalaire significatif et selon Legault et Pichette [35] le β -caryophyllène est un antioxydant.

CONCLUSION

L'utilisation de la technique de CG/SM nous a permis d'identifier les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* notamment les sesquiterpènes. L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH a confirmé les propriétés modestes que possède l'huile essentielle de la mélisse à réduire les radicaux libres. Les résultats obtenus ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives.

Des études complémentaires seront nécessaires afin d'en déterminer les mécanismes d'action et les applications possible en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Iserin. P., Masson. M., Restellini. J-P., Ybert. E., De La Roque. R., Vican. P. & Ybert. E. (2001). *Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins.* Larousse / VUEF, Paris. 335 p, pp : 8- 143.
- [2]. Teuscher. E., Anton. R. & Lobstein. A. (2005). *Les plantes aromatiques : Epices, aromates condiments et huiles essentielles.* Lavoisier, technique et documentation. 519 P, 3 – 480.
- [3]. Anonyme. (2003). Plantes et médicaments Semences la lettre gnis. Bulletin de l'institut biotechnologique des plantes. Conseil national de recherches. Canada, IBP.CNRC. Numéro 01. Avril 2003.
- [4]. Tadhani. M.B., Patel. V.H. & Subhash. R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J Food Compos Analysis.* 20:323–9.
- [5]. Meddour. A., Yahia. M., Benkiki. N., Ayachi. A. (2013). Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L.. *Lebanese Science Journal*, 14(1): 49-60
- [6]. Padrini. F. & Lucheroni. M.T. (2003). *Le grand livre des huiles essentielles.* Editions De Vecchi S.A., Paris. dépôt légal : Avril 2006, 206p.
- [7]. Hayon. (2007). *Les plantes médicinales qui nous soignent, tradition et thérapeutique.* Edition Ouest France. p 22, 23.
- [8]. Delille. L. (2007). *Les plantes médicinales d'Algérie.* Berti éditions. Alger. 240p.
- [9]. Halimi. A. (2004). *Les plantes médicinales d'Algérie.* Edition Berti. p304.
- [10]. Beloued. A. (2005). *Plantes médicinales d'Algérie.* Edition office des publications universitaires. 284p.
- [11]. Bardeau F. (2009). *La pharmacie du bon dieu.* Edition LANOR. p169.

- [12]. **Teuscher. E., Anton. R. & Lobstein. A. (2005).** *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles.* 522p.
- [13]. **Delaveau. P. (2001).** *Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique.* Edition Louis Pariente.
- [14]. **Babulka. P. (2005).** Les plantes de nos tisanes : La mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Phytothérapie*, 3: 114-117.
- [15]. **Talbi. H., Boumaza. A., El-mostafa. K., Talbi. J. & Hilali. A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Mater. Environ. Sci.* 6 (4): 1111-1117.
- [16]. **Sanchez Moreno. C., Larrauri. J.A. & Saura Calixto. F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Of The Science Of Food & Agriculture.* 76(2): 270-276.
- [17]. **Hazzit. M. (2008).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. Thèse de doctorat en chimie, Faculté de chimie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, 130p.
- [18]. **Molyneux. P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) of estimating antioxidant activity. *Journal of science technology*, 26(2): 211-219.
- [19]. **Touaibia. M. & Chaouch. Z. (2013).** Evaluation de l'effet anti-oxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus *in situ* et *in vitro*. *Revue Agrobiologia*, 3(1): 64-71.
- [20]. **Ghedadba. N., Bousselfela. H., Hambaba. L., Benbia. S. & Mouloud. Y. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Pharmacognosie. Phytothérapie.* 12:15-24.
- [21]. **Ronat. N. (2001).** La mélisse (*Melissa officinalis* L.). Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université Joseph Fourier. Faculté de pharmacie de Grenoble. 99p.
- [22]. **Schnitzler. P., Schuhmacher. A., Astani. A. & Reichling. J. (2008).** *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Science Direct. Phytomedicine* 15: 734-740.
- [23]. **LAIB. I. & BARKAT. M. (2011).** Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs séchées de *Lavandula officinalis*. *Agriculture* 2: 89-101.
- [24]. **Anton. R. & Wichtl. M. (2003).** *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* 2^{ème} édition, Lavoisier. 692p.
- [25]. **Ghelardini. C., Galeotti. N., Di Cesare Mannelli L., Mazzanti. G. & Bartolini. A. (2001).** Local anaesthetic activity of β -caryophyllene, *Il Farmaco* 56 387–389.
- [26]. **Skold. M., Karlberg. A.-T., Matura. M. & Borje. A. (2006).** The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology* 44 538–545.
- [27]. **Fernandes. E. S., Passos. G. F., Medeiros. R., Da Cunha. F. M., Ferreira. J., Campos. M. M., Pianowski. L. F. & Calixto. J. B. (2007).** Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, *European Journal of Pharmacology* 569: 228–236.
- [28]. **Michielin. E. M. Z., Rosso. S. R., Franceschi. E., Borges. G. R., Corazza. M. L., Oliveira. J. V. & Ferreira. S. R.S. (2009).** High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene, *J. Chem. Thermodynamics* 41 :130–137.
- [29]. **De Sousa. AC., Alviano. DS., Blank. AF., Alves. PB., Alviano. CS. & Gattass. CR. (2004).** *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol.* 56(5) :677-81.
- [30]. **Bounihi. A. (2015).** Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de doctorat national. Université Mohammed V. Faculté de médecine et de pharmacie. Rabat. 199p.
- [31]. **Tsimogiannis. D.I. & Oreopoulou. V. (2004).** Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5:523-528.

- [32]. **Kouri. G., Tsimogiannis. D., Bardouki. H. & Oreopoulou. V. (2007).** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8:155-162.
- [33]. **Bondet. V., Williams. W.B. & Berset C. (1997).** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft and Technologie*. 30:609-615.
- [34]. **Ruberto. G. & Baratta. M.T. (2000).** Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69:167–174.
- [35]. **Legault. J. & Pichette. A. (2007).** Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(12): 1643-1647.

Participation aux séminaires

Communication orale intitulée :

« Etude de l'effet anti-inflammatoire et antispasmodique de l'Huile essentielle de la mélisse : *Melissa officinalis* L. »
Au niveau du **V^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR)**, tenu à Tabarka – Tunisie, du 22 au 25 mars 2017.

Communication Affichée intitulée :

« Extraction de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante médicinale : *Melissa officinalis* L. »
Au niveau du **1^{er} Congrès International sur les Biotechnologies au service du développement durable (CIBSDD)**, tenu à l'université de Boumerdès – Algérie, du 24 au 25 octobre 2017.

Communication orale intitulée :

« Etude histologique d'une plante médicinale : *Melissa officinalis* L. »
Au niveau du **1^{er} séminaire national de « Phytothérapie & Santé »**, tenu à l'université de Blida1 – Algérie, du 16 au 18 mai 2017.