

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE et POPULAIRE

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

Université de Blida-1-



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et Organismes**

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

En Biologie

Option : Phytothérapie et Santé

Thème

Etude phytochimique des extraits de la mélisse (*Melissa officinalis* L.) et évaluation de leurs activités biologiques.

Présenté par :

KHALI Ihssene

et

HENNA Fella

Soutenu le: 13 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

M^{me} BENSALLAH L.	MAB	USDB	Présidente
M^{me} BENMENSOUR N.	MAA	USDB	Examinatrice
M^{me} BELGUENDOZ R.	MCB	USDB	Promotrice
M^{me} AYACHI N.	MAA	SAIDAL	Co-promotrice

Année universitaire

2014-2015

Remerciements

*Nos sincères remerciements et nos profondes reconnaissances vont à nos Directrices du mémoire **M^{me} BELGUENDOZ R.** Maitre assistante à l'Université de Blida -I- et **M^{me} AYACHI N.** Maitre assistante au CRD, pour leurs dévouements, leurs conseils, leurs confiances et leurs soutiens tout au long de l'élaboration de ce travail.*

*Nous remercions vivement **M^{me} BENSSALAH L.** Maitre-assistant à l'Université de Blida -I- d'avoir accepté de présider le jury.*

*Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements à **M^{me} BENMENSOUR N.** Maitre assistante à l'Université de Blida- I- de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail et participer au jury.*

*Nous remercions vivement **Mme HOUMANI Z.** d'avoir nous accepter à travailler au laboratoire de biotechnologies des plantes aromatiques et médicinales.*

*Nous remercions aussi **M^{me} CHEBATA** et **M^{me} GHANAI** pour leurs conseils et leurs soutiens.*

Nous tenons également remercier vivement tous les membres du parc national de Chréa pour leurs aides, leurs grandes sympathies et leurs conseils

Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants qui nous ont donné les bases de la science.

Cette liste de remerciements n'est pas exhaustive, que tous ceux avec lesquels nous avons interagi lors de ce travail, sans toutefois les avoir cités si dessus, sachent que leur contribution à la réalisation de ce mémoire a été grandement appréciée.

Dédicace



Je dédie ce modeste travail

Aux lumières qui ont toujours éclairées mon chemin

Aux sources de mon énergie

A ceux que

J'ai le plus chers au monde:

Ma mère et mon père.

De m'avoir si bien éduqué et enseigner pour arriver à ce jour et surtout le soutien moral, je tiens à leur dire aussi que je ne pourrais qu'être fière d'eux.

A mes chers frères : Mohamed et younes.

A ma chère sœur : Narimene.

A toute ma famille paternelle Henna et maternelle Kdib.

A ma copine Ihssene à qui je la souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.

A tous mes amis et mes collègues d'étude.

A tous qui m'aiment

FELLA

Dédicace



Maman, comment ne pas commencer par toi, celle que j'aime. Ces nuits parsemées d'insomnies, ta patience ta douceur, ton amour et tes encouragements qui ont fait de moi celle que je suis aujourd'hui, je t'aime si fort que tu le croies.

Mon père symbole de force, d'amour et de patience. Je te dis merci pour tous ce que tu as fait pour moi je t'aime beaucoup.

A mes chères Frères et ma sœur Mohamed Amine, Bilel et ma sœur Romaissa, je vous aime.

A mes très chères grands-mères Fatiha et Zoubida, je vous aime Merci.

A mes très chères Grands-pères Mohamed et Omar, je vous aime Merci.

A mes chères Tante Nabila, Amel et Souad, je vous aime Merci.

A mes chères oncles Hamza et Billel, je vous aime Merci.

A mes chères cousins et cousines Riane, Serine, Nour, Amira, Anis, Naila, Farah, Serine et moustapha.

A ma très chères copine Meriem et je la remercie pour son soutien et ces encouragements, je t'aime.

A mes très chères amis Fella, Wafa, Salih, Yasmine

IHSSENE

ABSTRACT

The purpose of the valuation of the Algerian flora, we are interested in studying plant *Melissa officinalis* L. et secondary metabolites. This perennial herb belongs to the family Lamiaceae every answered in Algeria.

Phytochemical screening revealed the presence of gallic tannins, saponins, flavonoids and alkaloids in traces. The extraction of polyphenols by the solid-liquid method gave a yield of 21.8%. The dosage of this extract presented grading 1.2535 mg EAG / g. Chromatographic analysis of the phenolic extract by HPLC revealed the presence of vanillin (27.9926%) at Tr 10.406 min, caffeic acid (24.6381%) Tr 2.875 min, rutin (10.8544%) Tr 9.310 min and gallic acid (2.7681%) to 2.572 min Tr. The extraction of ET from the aerial part of *Melissa officinalis* was accomplished by steam distillation, the yield of essential oils 0.26%. Chromatographic characterization (GC / MS) allowed to recognize it high esters, alcohols and alkanes.

Evaluation of the antioxidant activity by the DPPH test showed a significant antioxidant effect with a percentage of 93.82%, comparing with the 96.82% ascorbic acid. The study of the antimicrobial activity of the extracts showed a significant inhibitory action of the essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* L. strain. However extract polyphenols and hydrolat have any antibacterial effects.

The study of acute toxicity of essential oils on NMRI mice were given a lethal dose (LD₅₀) equal to 5.5 mg / kg.

Keywords: *Melissa officinalis* L., essential oils, total polyphenols, antioxidant, antimicrobial, acute toxicity.

الغرض من التقييم من النباتات الجزائرية، ونحن مهتمون في دراسة ميليسا اوفيسيناليس
الثانوية. هذا عشبة معمرة ينتمي إلى أسرة Lamiaceae المعروفة .

وكشف الفحص الكيميائي النباتي وجود العفص الغالية، الصابونين، الفلافونويد وقلويدات في آثار.
استخراج مادة البوليفينول التي كتبها الطريقة الصلبة والسائلة عائد 21.8 . قدمت جرعة من هذا المقتطف
HPLC / mg EAG1.2535 . وكشف التحليل الكروماتوغرافي للاستخراج الفينول من قبل HPLC
فانيليا (27.9926) min Tr10.406 caffeic (24.6381) min2.875، وروتين
ET (10.8544) min9.310 (2.7681) min2.572 طن تبريد.
من الجزء الجوي من ميليسا اوفيسيناليس عن طريق التقطير البخار، العائد من الضروري النفط هو 0.26 . يسمح
توصيف الكروماتوغرافي (GC / MS) العالية استرات، والكحول والكانات.
وأظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار DPPH تأثير مضاد للأكسدة كبيرا بنسبة 93.82
82 % من حامض الاسكوربيك. أظهرت دراسة أن نشاط الميكروبات من مقتطفات عمل المثبطة
كبير من الزيت العطري على نمو سلالة المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*).
استخراج مادة البوليفينول وhydrolat لديك أي تأثيرات مضادة للجراثيم.
وقدمت دراسة السمية الحادة من الزيوت الأساسية على الفئران NMRI (LD50) 5.5 . /

كلمات البحث : ميليسا اوفيسيناليس، الزيوت الأساسية، ومجموع البوليفينول، ومضادات الأكسدة، مضادات
الميكروبات، السمية الحادة

Résumé

Dans le but de la valorisation de la flore Algérienne, nous nous sommes intéressé à étudier la plante aromatique *Melissa officinalis* L. et ses métabolites secondaires. Cette herbacée vivace appartient à la famille des lamiacées très répandue en Algérie.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de tanins galliques, des saponosides, des flavonoïdes et des alcaloïdes en traces. L'extraction des polyphénols par la méthode solide-liquide a donné un rendement de 21.8%. Le dosage de cet extrait a présenté une teneur de 1.2535mg EAG /g. L'analyse chromatographique de l'extrait phénolique par HPLC a révélé la présence de la vanilline (27.9926%) à Tr 10.406min, l'acide caféique (24.6381%) à Tr 2.875min, la rutine (10.8544%) à Tr 9.310min et l'acide gallique (2.7681%) à Tr 2.572min. L'extraction de l'HE de la partie aérienne de *Melissa officinalis* L. a été accomplie par hydrodistillation. nous avons obtenu un rendement de 0,26% en huile essentielle. La caractérisation chromatographique (CG/MS) a permis de reconnaître sa richesse en esters, alcools et alcanes.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH a permis de constater un effet antioxydant important avec un pourcentage de 93.82%, en comparant avec l'acide ascorbique 96.82%. L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits a révélé une importante action inhibitrice de l'huile essentielle sur la croissance de la souche *Staphylococcus aureus*. Cependant l'extrait des polyphénols et l'hydrolat n'ont aucuns effets antibactériens.

L'étude de la toxicité aigüe des huiles essentielles sur des souris N.M.R.I a donné une dose létale (DL50) égale 5,5 mg/kg.

Mots clés : *Melissa officinalis* L., polyphénols totaux, huiles essentielles, antioxydante, antimicrobienne, toxicité aigüe.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

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

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil.

NMRI: Naval Medical Research.

VIT C: acide ascorbique

ONAB : Office National des Aliments et du Bétail.

PPT : Polyphénols totaux

HA : Hydrolat

HE : Huile essentielle

Liste des figures

Figure 1 : La plante de la mélisse poussant à l'état spontané.....	P9
Figure 2 : La tige et la fleur de la mélisse.....	P10
Figure 3 : Les feuilles de la mélisse	P10
Figure 4 : Structure chimique des principaux constituants de l'HE de la mélisse.....	P12
Figure5 : La plante de <i>Melissa officinalis</i> L. poussant à l'état spontanée a Hammam Meloune.....	P16
Figure6 : Schéma de la partie expérimentale.....	P18
Figure 7 : Séchage de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P19
Figure 8 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.....	P18
Figure 9 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux.....	P22
Figure 10 : Montage d'extraction de l'huile essentielle des feuilles et tiges de la mélisse par hydrodistillation (dispositif Clevenger).....	P26
Figure 11 : la méthode d'aromatogramme sur boite de Pétri.....	P29
Figure12: Administration orale par gavage de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P32

e des feuilles et tiges de la mélisse par hydrodistillation (dispositif
Clevenger).....24

Figure 12 : la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétri.....26

Figure13: Administration orale par gavage de l'HE de *Melissa officinalis*L.....32

Liste des tableaux

Tableau : Position systématique de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P8
Tableau : Appellation de la mélisse en différentes langues.....	P8
Tableau : Microorganismes testés.....	P17
Tableau : diamètres des zones d'inhibition selon le degré de sensibilité...	P31
Tableau : Screening phytochimique des feuilles de <i>Melissa officinalis</i>	P34
Tableau : Rendement des polyphénols de la mélisse.....	P35
Tableau : principaux composés contenus dans les polyphénols en fonction du temps de rétention ($\lambda = 270\text{nm}$).....	P37
Tableau : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P40
Tableau X : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différentes souches bactériennes.....	P42
Tableau X : Résultat de la toxicité aiguë de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L. administrée par voie orale.....	P 42

Liste des tableaux

Tableau :Position systématique de *Melissa officinalis* L.

Tableau :Appellation de la mélisse en différentes langue.

Tableau :Microorganismes testés.

Tableau :Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de d'huiles essentielles, de l'extrait des polyphénols totaux et l'hydrolat

Tableau :

Tableau :

Tableau :

Tableau :Rendement des polyphénols de la mélisse.

Tableau X :Screening phytochimique des feuilles de *Melissa officinalis*.

Tableau X :Principaux composés contenus dans les polyphénols en fonction du temps de rétention

(=320nm).

Tableau X :Principaux composés contenus dans les polyphénols en fonction du temps de rétention (=370nm).

Tableau X :Les IC50 l'acide ascorbique et l'extrait phénolique testé.

Glossaire

Akène : fruit sec à une seule graine, qui ne s'ouvre pas spontanément.

Analgésique : est une substance qui combatte les douleurs.

Antifongique:qui détruit les champignons parasites.

Antimicrobienne : sont des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance.

Antioxydant : molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Antispasmodique : Qui réduit les spasmes, les crampes, et les contractions Musculaires.

Antiviral:consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture.

Béchique : qui guérit la toux

Carminative : est une substance qui résorbe les gaz intestinaux.

Inflorescence : c'est l'ensemble des fleurs regroupées sur le même axe.

Sédatif : est une substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central.

Stomachique : est une substance qui favorise la digestion.

Thuyone : est une molécule présente dans l'absinthe. Elle est très convulsivante et provoque des hallucinations.

Toxicité aiguë est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive de toxique, décrite comme la dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant. Elle est parfois notée LD50.

Vivace :se dit d'une plante qui vit pendant trois années au moins.

(BELOUED, 2001,DELILLE, 2007, HAYON,2007, KOYTCHE, ALKEN et DUNDAROV, 1999, VALNET, 1983 et 1990, THURZOVA,1981, WEPIERRE,1981).

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I :Partie bibliographique.....	3
1. Généralité.....	3
1.1. Plantes médicinales.....	3
1.2. Phytothérapie.....	3
1.2.1. Actualité de la phytothérapie	3
1.3. les huiles essentielles	3
1.4. Les polyphénol	6
2. Généralité sur la plante étudiée <i>Melissa officinalis</i> L.....	7
2.1. Historique.....	7
2.2. Systématique.....	8
2.3. Nomenclature.....	8
2.4. Origine et répartition géographique	9
2.5. Description botanique	9
2.6. Composition chimique de la mélisse.....	11
2.7. Culture de la mélisse.....	12
2.8. Récolte de la mélisse.....	13
2.9. Usage de la mélisse.....	13
Chapitre II. Matériel et méthodes.....	15
1.1. Matériel.....	15
1.2. Méthodes d'étude.....	17
1.2.2. Séchage et broyage.....	19
1.2.3. Screening phytochimique.....	19
1.2.4. Extraction des polyphénols totaux.....	21
1.2.5. Dosage des polyphénols totaux.....	23
1.2.6Analyse chromatographique par HPLC.....	24
1.2.7. Extraction des huiles essentielles	25
1.2.8. Activités biologiques.....	27
Chapitre III : Résultats et discussion.....	34
1.Screening phytochimique.....	34

2. Le rendement en polyphénols totaux	34
3. Dosage des polyphénols totaux.....	35
4. Analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	36
5. Le rendement des huiles essentielles.....	38
6. Activités biologiques.....	40

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

De nos jours l'efficacité de la médecine par les plantes est reconnue et démontrée scientifiquement, leurs bienfaits incontestables pour notre santé ont permis à la phytothérapie d'être présente dans notre vie quotidienne (GUEBAILIA, 2007).

Les plantes constituent une réponse de choix pour fournir à l'organisme, de façon naturelle, les substances nécessaires pour maintenir son équilibre vital(GUEBAILIA, 2007).

À travers les siècles et les continents, les hommes ont su acquérir la connaissance des plantes et leurs propriétés thérapeutiques, les médecines traditionnelles (Européenne, Chinoise, Indienne, Sud-Américaine ou Africaine) sont riches en expériences accumulées depuis les temps les plus anciens sur les plantes existantes (BRUNETON J, 1999).

En Algérie la pratique de la médecine par les plantes a toujours existé en raison de la diversité de la flore, qui est particulièrement riche en plantes (BELOUED, 2001).

En effet, plusieurs espèces se trouvent répandues sur des centaines d'hectares dans toutes les régions du pays comme la lavande, le romarin, la sauge, l'ortie, la mauve, le thym, la mélisse...etc. (MARTINI MC, 2008).

En dehors des plantes médicinales classiques, souvent officinales, connues et utilisées depuis plus ou moins longtemps, il reste encore beaucoup à faire pour dresser l'inventaire complet des espèces susceptibles d'application thérapeutique, il faudra étudier toutes les plantes utilisées en médecine populaire indigène. Pour cela, nous proposons notre étude sur la plante « *Melissa officinalis* L.» appartenant à une grande famille qui est les lamiacées, employées par la médecine traditionnelle en raison de ses propriétés sédative(THURZOVA,1981),carminative(DELILLE, 2007), antispasmodique (VALNET, 1983 et 1990), antivirale(KOYTCHE, ALKEN et DUNDAROV,1999)et antioxydante. Son huile essentielle présenterait une activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antifongique(HAYON,2007).

En Algérie, la mélisse officinale est récoltée à l'état sauvage et commercialisée par les herboristes en vue d'une utilisation purement traditionnelle pour combattre la douleur et favoriser le sommeil(BERNARD,2012). Sans pour autant qu'elle soit exploitée à l'échelle industrielle tel que la pharmacie et la cosmétologie.

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes fixés comme objectif l'extraction des huiles essentielles et des polyphénols totaux de la mélisse (*Melissa officinalis* L.), à partir de

Introduction

la partie aérienne de la plante poussant à l'état spontané dans la région de (Hamammelouane), en vue de mettre en exergue les propriétés pharmacologiques de cette plante et constituer une base objective et scientifique argumentant l'utilisation précise et sécurisée de ces extraits. Pour cela nous avons entrepris les étapes expérimentales suivantes :

- Un screening phytochimique est réalisé sur la poudre et l'infusé de la mélisse.
- Extraction de l'huile essentielle (HE) et des polyphénols totaux de *Melissa officinalis* L.
- Analyse par CG-MS de l'huile essentielle afin de connaître sa composition qualitative.
- Analyse chromatographique de l'extrait phénolique par HPLC pour la détermination qualitative des différents composés chimiques de l'extrait.
- Evaluation de l'activité antioxydante des polyphénols totaux.
- Dosage analytique des polyphénols totaux par UV-VIS.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, des polyphénols et de l'hydrolat sur des souches microbiennes de référence.
- Etudes de la toxicité aigüe de l'huile essentielle sur des animaux de laboratoire.

1. Généralité

1.1. Plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**DELILLE, 2007**). Cependant, de nombreuses plantes sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme de principes actifs comme précurseurs pour l'obtention de médicaments. L'emploi incontrôlé de plantes cueillies dans la nature peut aboutir à des intoxications graves, voir mortelles (**MAGNAMI, 1979**).

1.2. Phytothérapie

La phytothérapie est le traitement par les plantes médicinales ou leurs formes dérivées, dont on distingue deux types (**DEBUIGNEG, 1984**).

- Une pratique traditionnelle, basée sur l'utilisation de plantes réputées médicinales, qui est encore massivement employée, est une médecine parallèle du fait de l'absence d'études cliniques.

- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments: c'est la pharmacognosie.

1.2.1. Actualité de la phytothérapie

La médecine traditionnelle a toujours occupée une place importante dans les traditions de la médication algérienne. Durant les dernières années, la phytothérapie s'est très vite répandue et des herboristes se sont installés sans aucune formation spécialisée ou connaissance scientifique sur la phytothérapie. En effet ils utilisent des plantes et des mélanges de plantes pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables (**SEBAI et BOUDALI, 2012**).

1.3. Huiles essentielles

Les Huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante, issues du métabolisme secondaire de la plante (**BRUNETON, 1993**). Le terme (huile) s'explique par les propriétés des HE à se solubiliser totalement dans les graisses, insolubles dans l'eau, visqueuses et hydrophobes. Le terme (essentiel) se fait référence à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**NAVES, 1974**).

D'après la pharmacopée française (1965) «les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation» (RAYNAUD, 2006).

Selon AFNOR: «Ce sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau, ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques ».

1.3.1. Synthèse et localisation des huiles essentielles dans la plante

Les HE se forment dans le cytoplasme des cellules sécrétrices (Lauraceae), ou elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules du mésophile, ou des cellules épidermiques, ou dans les glandes oléifères (PARIS et HARBIELLE, 1981). L'excrétion de ces essences dans la cavité des poches, ou des canaux est réalisée par exocytose ou par lyse des cellules bordant la cavité (GUIGNARD, 2001).

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (BRUNETON, 1999), qui sont des cellules glandulaires variables suivant la famille botanique, par exemple : les cellules sécrétrices (Lauraceae), les poches sécrétrices (Myrtaceae), les canaux excréteurs (Asteraceae), et les poils sécréteurs (Geraniaceae) (SALLE, 1991).

Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (PARIS et HARBIELLE, 1981).

1.3.2. Répartition des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier) et bien que ce soit moins habituel dans des écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal...), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (toutes épices, anis, badiane), les graines (muscade) (BRUNETON, 1993).

Leur biosynthèse est liée à des cellules spécialisées rarement isolées (feuilles de laurier, gingembre), le plus souvent regroupée en poches (Rutacées, myrtacées...) ou en canaux sécréteurs (Apiacées, Astéracées) (GUIGNARD, 2000).

1.3.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à deux grands groupes chimiques en fonction de leur voie de biosynthèse, les terpènes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (CROTEAU *et al.*, 2000).

A. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isopréniques en (HERNANDEZ, 2005) :

- **Monoterpènes** : formes de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$).
- **Sesquiterpènes** : formes de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$).
- **Diterpènes** : formes de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$).
- **Tetraterpènes** : huit iso terpènes qui conduisent aux caroténoïdes.
- **Polyterpènes** : n peut-être de 9 à 30 (C_5H_8)

B. Composés aromatiques

Les dérivés de phénylpropane sont moins abondants que les composés terpéniques. Cette classe comprend des composés odorants (ROUX et CATIER, 2007).

C. Composés d'origines diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléiques et les acides linoléiques (PIOCHON, 2008).

1.3.5. Toxicité des huiles essentielles

De nombreux ouvrages font référence à la toxicité de produits phytopharmaceutiques, néanmoins celle des HE est moins investiguée (BRUNETON, 1999, BAUDOUX, 2000 ; LIS-BALCHIN, 2005 ; STEFLITSCH, 2008). On trouve cependant quelques informations sur les toxicités suivantes :

- **Toxicité par ingestion** : Les HE d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg à l'exception de la sarriette et de l'origan. (BRUNETON, 1999).

- Toxicité dermique : Les HE qui font un large usage dans la parfumerie peuvent présenter une éventuelle toxicité par application locale. Le thym, la sarriette et la cannelle sont connus pour leur pouvoir irritant (**MARTINI,2006**).
- Toxicité selon la composition : Certaines HE sont classées selon la composition et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des essences à thuyones est neurotoxique. (**BRUNETON, 1999**).

1.4. Les polyphénols

Le terme polyphénols a été introduit en 1980, en remplacement au terme ancien de Tanin végétal (**STANLEY *et al.*, 2003**). Il est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux (**FLEURIET *et al.*, 2005**).

Les polyphénols également dénommés composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal (**MAROUF, 2000**), on les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (**BAHORUN, 1997**). Ils présentent l'une des principales classes de métabolites secondaires (**LUGASI *et al.*, 2003**). Dans le règne végétal : plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. Ils peuvent être regroupés en dans nombreuses classes (**HARBONE, 1989**). L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupement hydroxyle(s) ; libre(s) ou engagé(s) dans une autre fonction chimique (ester métallique, ester, sucre) (**ESCARPA *et GONZALEZ, 2001***).

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (**SARNI-MANCHADO *et CHEYNIER, 2006***).

➤ Différents classe de polyphénols

D'après **DACOSTE, (2003)**, les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- **Les phénols simples (C6)** : un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6-C1).
- **Les flavonoïdes (C6-C3-C6)** : deux noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.

- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C6-C2-C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

2. Généralité sur la plante étudiée *Melissa officinalis* L.

2.1. Historique

La mélisse est connue depuis de 2000 ans, les grecs et les latins l'utilisèrent traditionnellement pour ses vertus culinaires et médicinales contre les troubles de système nerveux (SPECK, URSULA et FOTSCH, 2009). C'est une vieille plante mellifère, médicinale, et aromatique (JOREK,1983;BARTELES,1998;BARDEAU,2009).

Le nom de Mélisse veut dire en grec « abeille », c'est pour cela qu'on l'appelle également Piment des abeilles (DEVAVEAUP et al.,1989). Autrefois, on frottait des feuilles de Mélisse sur les ruches pour attirer de nouvelles abeilles.

La plante exhale dans sa jeunesse un agréable parfum rappelant celui du citron, c'est pour cela qu'on l'appelle également Citronnelle ou Citronnade. (COUPLAN et STYNER, 1994).

Les feuilles de mélisse ont été utilisées traditionnellement depuis Théophraste et Hippocrate, puis au XVe siècle par Paracelse, pour améliorer les fonctions digestives et les états de nervosité (ANTON et WICHTL, 2003).

Du XVe au XVIIe siècle on utilisait principalement l'hydrolat de Mélisse (eau de Mélisse) appelée aussi (eau des Carmes) qui est un remède populaire recherché actuellement pour ses propriétés antispasmodiques et stomachique (SALLE, 1991).

Depuis, de nombreuses études ont été faites, notamment en 1978, en Allemagne ou les propriétés antivirales de la plante ont été mises en évidence et confirmées par des recherches menées durant les années 90 sur le virus de l'herpès (ROUX, 2005).

2.2. Systématique

En 2003, l'APG II (Angiosperm Phylogeny Group) proposait une classification phylogénique des Angiospermes (tableau 1) (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP,1998).

Tableau 1: Position systématique de *Melissa officinalis* L.

Règne :	Végétal.
Embranchement :	Spermaphytes.
Division :	Angiospermes / Magnoliophyta
Classe :	Eudicotylédones.
Sous classe :	Euasteridées I
Ordre :	Lamiales.
Famille :	Lamiaceae
Genre :	<i>Melissa</i> .
Espèce :	<i>M. officinalis</i> L.
S. espèce :	<i>officinalis</i> .

On distingue les sous-espèces suivantes (**TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005**) :

Melissa officinalis L. Ssp. *Officinalis*.

Melissa officinalis L. Ssp. *Altissima*.

Melissa officinalis L. Ssp. *Inodora*.

2.3. Nomenclature

Le nom latin « Melissa » trouve ses racines dans le nom grec Meleia (meli, melitos = miel). Autrement, *Melissa* signifie en Grec « abeille » relatif à son nectar qui est recherché par les abeilles (**BIANCHINI et CORBETTA, 1975**).

Le terme *officinalisa* été donné pour la première fois par Carl Von Linné (1707-1778), ce terme a été mentionné dans la pharmacopée française en 1733 et l'utilisation du mot officine, qui signifie en Français « pharmacie » lui a été attribuée pour la première fois en 1812 (**PENCHEV, 2010**).

Cependant, cette plante présente plusieurs noms vernaculaires dont on cite :

Tableau 2 : Appellation de la mélisse en différentes langue

Langue	Appellation	Auteurs
Arabe	Touroudjan, Tindjan, Bararendjabouya, Merzizou, Ferzizoua (feuille d'abeille).	(BABA AISSA, 1999)(BELOUED, 2001)
Français	Céline, Citronnade, Citronnelle, Piment des abeilles, Thé de France, herbe au citron.	(GIRRE, 2001)(BELOUED, 2001)
Anglais	Lemon balm, Bee balm, sweetbalm.	(BOCK, 2010)



Figure1 : la partie aérienne de la mélisse

2.4. Origine et répartition géographique

2.4.1. Dans le monde

En générale *Melissa officinalis* L. est originaire de l'Europe centrale, orientale et méridionale, de l'Asie occidentale (Turquie) et de l'Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie) (TRUELLE, 2009) elle est spontanée dans l'Atlas marocain, notamment dans la région d'Agadir. (AIT YOUSSEF, 2006). Elle croit aussi à l'état spontané dans presque toute la France, particulièrement dans les Alpes, les Pyrénées (RAHTIYARCA BAGDAT et COSGE, 2006). MONTRER

2.4.2. En Algérie

La mélisse officinale pousse de manière spontanée au niveau des ravins humides des montagnes du Djurdjura, des Babors, de Mouzaia (BELOUED, 2001) et de l'Atlas Blidéen (BABA AISSA, 1999).

2.5. Description botanique

C'est une plante herbacée touffue robuste et vivace qui se ramifie beaucoup, formant de grosses touffes de 30 à 80cm (BOTINEAU, 2011). Elle présente des racines grêles, cylindriques, dures et fibreuses (BARDEAU, 2009).

Figure 1: La plante de la mélisse poussant à l'état spontanée (ORIGINAL, 2015)

- Tiges : Elles sont dressées, ramifiées, glabres et très rameuses à section quadrangulaire (figure 2) (SPICHIGHER, 2002 ; TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005).



Figure2 : La tige et la fleur de la mélisse(BOWN, 2006)

- Feuilles : Les feuilles sont plus ou moins pétiolées (figure 3), de couleur verte foncée sur le dessus et légèrement pâles en dessous et mesurent environ 8 cm de long et 5 cm de large. Elles sont opposées, ovales et ovoïdes. Le limbe et la nervure sont fins, Le bord de la feuille est irrégulièrement dentelé(ANTON et WICHTL,2003).



Figure3 : Les feuilles de la mélisse (ORIGINALE, 2015).

- Fleurs : Les fleurs sont de couleur jaunâtre en bouton et blanches lorsqu'elles sont épanouies. Elles sont regroupées en 3 à 5 faux verticilles assez compacts, mais espacés les uns des autres. La floraison a lieu de la fin du mois de juin au mois de septembre (BIANCHINI et CORBETTA, 1975 ; BARTELS, 1998).

Le calice est en forme de clochette tubuleuse, très, de 7 à 8 mm de long. Il est bilabié ayant cinq dents dont deux inférieures et trois supérieures (BARTELS, 1998).

La corolle est monopétale ayant la forme d'un cylindre évasé au sommet, elle renferme des poils courts épars. 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.

- Fruit : C'est un tétrakène(BABA AISSA, 1999). Il est lisse de couleur châtain

(AIT YOUSSEF, 2006). Il contient quatre minuscules graines luisantes. La floraison se produit du mois de juin au mois d'Aout (TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005)

2.6. Composition chimique de la mélisse

La mélisse a fait l'objet de plusieurs études chimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. Les teneurs en principe actifs de la mélisse varient selon les conditions géographiques et climatiques, elle renferme :

a. Huile essentielle

Divers travaux de CARNAT *et al.*, (1998) ; SADRAEI, GHANNADI et MALEKSHAHI, (2003), ont montré que la composition de l'huile essentielle de la mélisse varie selon les différentes techniques d'extraction (hydrodistillation et extraction au CO₂ supercritique)

L'huile essentielle est constituée elle-même (ANTON et WICHTL, 2003) de: 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 (Figure 4), d'autres constituants minoritaires : -caryophyllène et au cours de la conservation elle se transforme en époxydes de -caryophyllène I et II, germacrène D, 6-méthylhept-5-ène-2-one, acétate de géranyle, -copaène, nérol, méthylcitronellal et géraniol (Figure 4), 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 (ANTON et WICHTL, 2003).

b. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ils sont appelés aussi tanins de lamiacées. Ils renferment l'acide rosmarinique, les acides caféique, chlorogénique et les acides mélitriciniques A et B (trimères de l'acide caféique) (BRUNETON, 1999, TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005).

c. Flavonoïdes : renferment 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 cosmiosine (apigénine-7-O-glucoside) ainsi que le rahmnazine (3,7-diméthoxykaempférol) et le 7-méthoxykaempférol (TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005).

d. Dérivés hydroxycoumariniques Esculetine (TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005).

e. **Acides triterpéniques**, notamment les acides ursolique et oléanolique (TEUSCHER, ANTON et LOBSTEIN, 2005).

f. **Les vitamines** : Les vitamines C et E et des principes amers (BABA AISSA, 1999 ; GOGU et al., 2005).

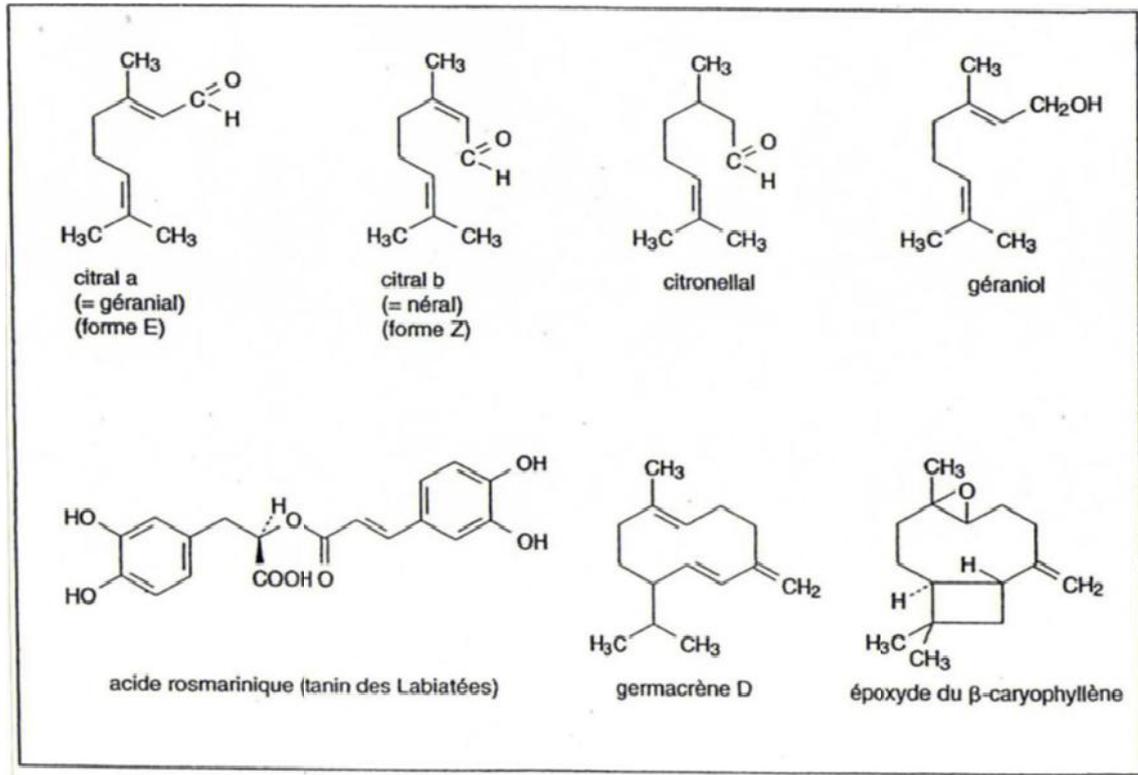


Figure 4: Structure chimique des principaux constituants de l'HE de la mélisse (ANTONet WICHTL, 2003).

2.7. Culture de la mélisse

La mélisse exige une terre profonde, saine et des sols riches en éléments nutritifs ou L'apport d'eau (irrigation) est régulier pour assurer une bonne vigueur de la plantation, un stress hydrique se traduit par un jaunissement de ses feuilles (GILLY, 2007), Cette plante préfère aussi les endroits bien exposée et ensoleillée.

La multiplication se fait par semis printaniers ou par division du rhizome (THURZOVA et al., 1985). Selon Munoz la mélisse est fertile et donne des graines qui germent à 35%, cette plante se resème souvent seule (BARNES, ANDERSON et PHILLIPSON, 2007).

2.8.Récolte de la mélisse

La première récolte ne se fait qu'après la deuxième année de culture. La floraison se produit généralement à Septembre (à la fin de l'été) (ANTON et WICHTL, 2003).

Les feuilles sont ramassées avant la floraison c'est-à-dire fin Avril à début juillet, puis séchées à l'air libre (ARNAL-SCHNEBELENet *al.*,2007) pour en retirer le maximum du potentiel thérapeutique (AIT YOUSSEF,2006).

Pour conserver la couleur verte, il est préférable de sécher la plante à l'ombre et à l'abri de l'humidité et la poussière (GILLY et DELILLE, 2007).

2.9. Usage de la mélisse

Melissa officinalis L. est utilisée en plusieurs domaines:

a. Usage thérapeutique

La mélisse est particulièrement indiquée lorsque l'anxiété est accompagnée de symptômes cardiaques (palpitations, hypertension) ou digestifs. Elle est rafraîchissante pour les conditions nerveuses d'excitation (BERNARD,2012).

La médecine populaire recourt à la mélisse en usage interne pour soigner les névralgies, les affections du bas ventre et les affections gastriques d'origine nerveuse, en cas de catarrhes bronchique chroniques, de faiblesses et enfin pour lutter contre l'hypertension (GRÜNWALD et JÄNICKE, 2006 ; JORG et JANICKE, 2007). Les feuilles possèdent des propriétés stomacalique, béchique, carminatif (DELILLE, 2007), antispasmodiques (VALNET, 1983 et 1990) et sédatives (THURZOVA, 1981). Cette plante protège nos cellules contre le vieillissement prématuré dû aux radicaux libres (BERNARD, 2012).

La douceur de la plante la rend très utile pour les petits problèmes de l'enfance : surexcitation, problèmes de sommeil, problèmes digestifs (BERNARD, 2012), les vomissements (DELILLES, 2007) et les coliques et la diarrhée (THURZOVA, 1981). Elle permet de lutter contre la mémoire déficiente, l'anémie. Le suc de la plante fraîche soulage les douleurs de piqûres de guêpes (BOULLARD, 2001).

Selon ISRIN (1997) l'infusion de la mélisse, à raison d'une tasse trois fois par jour, agit contre les maux de tête apaise, les rhums et la grippe. Une indication récente, validée par les études scientifiques, concerne les propriétés antivirales de la mélisse (KOYTCHE, ALKEN et DUNDAROV, 1999). La plante peut être utilisée pour soulager l'herpès

labial(ASTANI, REICHLING et SCHNITZLER,2008), et inhiber l'activité du virus qui est la cause de ce problème.

D'après BOULLARD (2001), l'huile essentielle de la mélisse est très utilisée en aromathérapie et phytothérapie du fait qu'elle possède des vertus analgésiques et bactériostatiques,elle est aussi conseillée pour ralentir l'activité de la thyroïde(HOSEIN et ROGERS,2005),ensuite c'est une excellente antibactérienne, antifongique et antivirale aussi,elle est efficace contre les brûlures d'estomac, les ballonnements, l'insomnie, les crises d'angoisse, le stress, et la migraine.(HAYON,2007).

b.Autres usages

b.1.Domaine culinaire :Selon BARTELS (1998) les feuilles de mélisse fraîches donnent aux salades, sauces et plats de légumes un délicat parfum.

b.2. Domaine agricole :La mélisse est souvent cultivée comme plante mellifère, les apiculteurs des régions méditerranéennes frottaient la plante sur les ruches pour attirer de nouvelles abeilles (BARTELS, 1998).

b.3. Domaine industriel:

b.3.1. En Cosmétologie

Les HEcontient un composant intéressant pour l'élaboration de divers produits de beauté tels que les shampoings, les dentifrices, (TRUELLE, 2009), elle entre également dans la composition de plusieurs produits d'hygiène (ROUX et al., 2008).

b.3.2.Pharmaceutique

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale (SCHNAUBELT, 1998).La mélisse entre dans les ingrédients de plusieurs médicaments somnifères, calmants sous forme galénique comprimés, gélules, crème à la mélisse et sachets pour la tisane.

b.3.3. Agro-alimentaire

L'activité antimicrobienne de la mélisse s'est avérée efficace pour inhiber la croissance des levures responsables de la détérioration des aliments (RAHT YARCABA DAT et CO GE, 2006). Elle est aussi utilisée comme additif dans les aliments (ADINEE PIRI et KARAMI,2008).

Notre stage pratique s'est étalé sur une période de 4 mois, de mars à juin 2015. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau de:

- Parc national de Chréa : pour la récolte de la plante *Melissa officinalis* L. poussant à l'état spontané au niveau de Hammam Melouane.
- Université de Blida I, département d'Agronomie, au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques: pour l'extraction des huiles essentielles, l'extraction, le dosage des polyphénols totaux et l'analyse par HPLC.
- Laboratoire de pharmacie galénique, département de pharmacie à l'université de Blida : Pour l'activité antioxydante.
- Centre de recherche et de développement (CRD) d'El Harrach: Pour le screening phytochimique et le test de la toxicité aiguë des huiles essentielles.
- L'hôpital de Boufarik : au laboratoire de bactériologie : Pour l'activité antimicrobienne.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

A. Matériel non biologique

Le matériel utilisé durant notre expérimentation : Verrerie, Réactifs et les appareils (Annexe 1).

B. Matériel biologique

B.1. Matériel végétal

Les parties aériennes (tiges et feuilles) ont été récoltées au mois d'Avril 2015, avant la période de floraison pour l'extraction des essences aromatiques de la mélisse de la région de Hammam Melouane.

L'identification de l'espèce *Melissa officinalis* L. a été effectuée à l'aide de la flore Algérienne (QUEZEL et SANTA, 1962) et authentifiée après consultation de l'herbier du parc national de Chréa du secteur de Hammam Melouane et au niveau de laboratoire des plantes aromatique et médicinale à l'aide des enseignants du département d'agronomie à l'université de Blida -I- .



Figure6 : La plante de *Melissa officinalis* L. poussant à l'état spontanée a Hammam Melouane(ORIGINALE,2015).

B.2. Matériel animal

Nous avons testé la toxicité des HE de *Melissa officinalis*L. sur des souris issues de l'élevage de l'animalerie du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL. Ces souris présentent les caractères suivants :

- Souris Albinos de race NMRI (Naval Médical Research Institute).
- Sexe : male, femelle
- Nombre : 18
- Poids : 19g à 20g
- Alimentation : Granulés « O.N.A.B »
- Boisson : Eau de robinet.

❖ Conditions d'hébergement

Les souris sont placées dans un local contrôlé. La température est comprise entre 20 à 24°C, la photopériode est de 10 heures par jour, le taux d'humidité est de l'ordre de 50%.

B.3.Microorganismes

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 l'institut pasteur

Tableau III : Microorganismes testés.

Microorganismes testés	Gram	Souches	Référence
	Gram+	<i>Staphylococcus aureus.</i>	AT CC 259 23
	Gram -	<i>Escherichia coli.</i>	AT CC 259 22
		<i>Kleibseilla pneumonie.</i>	AT CC 278 53
		<i>Salmonella typhi.</i>	AT CC 110 37

1.2. Méthodes d'étude

Dans notre expérimentation nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle et des polyphénols à partir des parties aériennes séché et conservé. L'extraction des huiles essentielles est effectuée par Hydrodistillation et les polyphénols ont été extraits par la méthode d'**OWEN etJOHNS (1999)**. Les extraits récupéré (HE et polyphénols) ont été caractérisé d'une part sur le plan physico-chimique par CG /MS pour l'HE et HPLC et par spectrophotométrie à UV-Vis pour les polyphénols afin d'identifier les composés majoritaires.

Sur le plan biologique, nous avons étudié le pouvoir antioxydants des extraits phénoliques, l'activité antibactérienne pour les deux types d'extraits et le test de toxicité aigüe pour l'HE.

Le schéma directeur ci- après résume la démarche suivie pour notre expérimentation (figure 7)

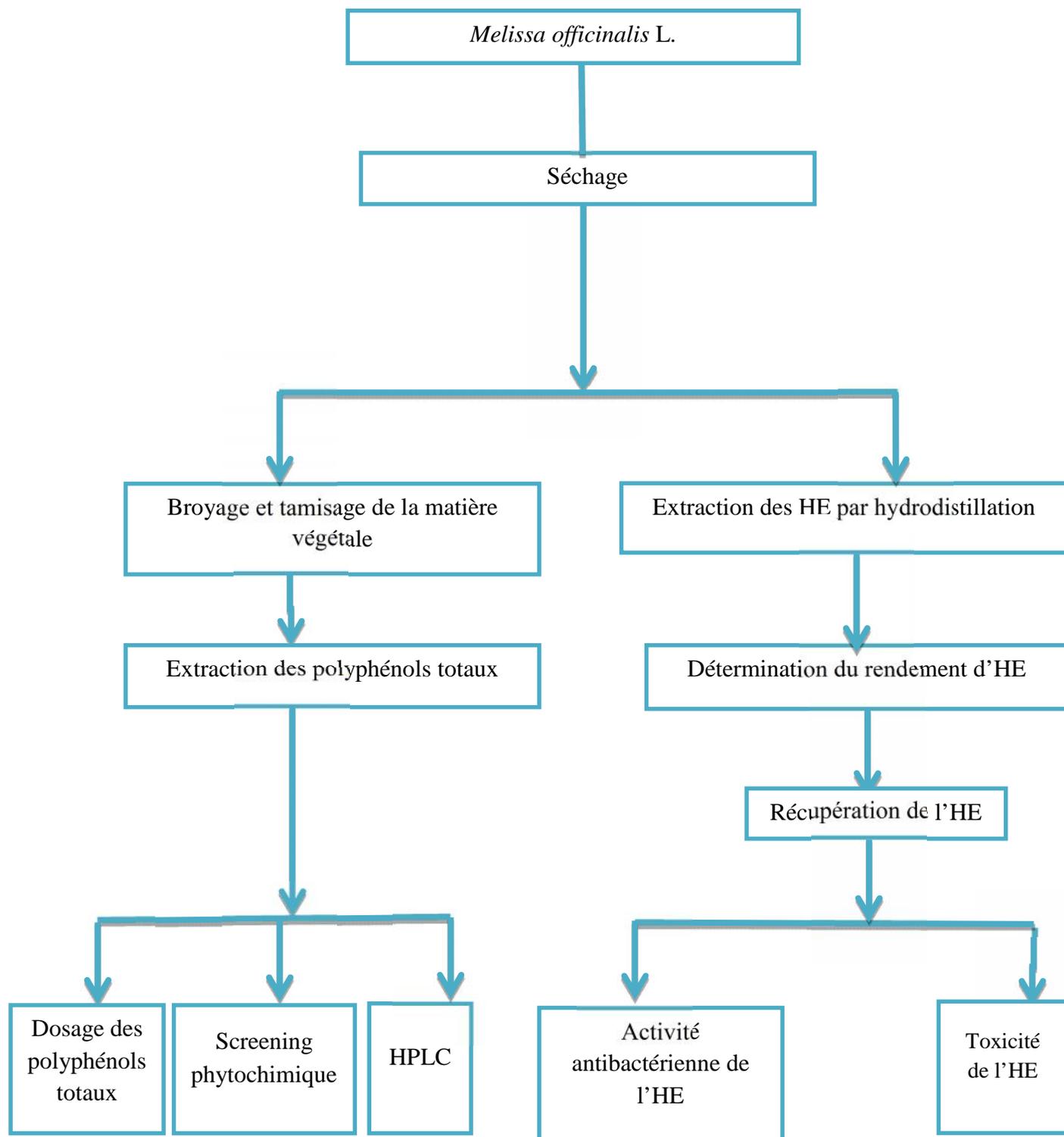


Figure 7: Schéma de la partie expérimentale.

1.2.2. Séchage et broyage

Le séchage de la plante (feuilles- tiges) a été effectué naturellement à l'abri de la lumière sur du papier blanc (figure8) dans un endroit bien aéré durant 15 jours afin d'éviter la photo- oxydation des substances (GUIGNARD, 2000 ; DELLILE,2007).

Après séchage, une bonne quantité des feuilles et des tiges a été conservé pour l'extraction des huiles essentielles.

Une autre quantité des feuilles a été broyée à l'aide d'un moulin à café pour l'obtention d'une poudre fine, qui a subi un tamisage pour séparer les particules trop grossières (LE HIR, 1983). Cette dernière est conservée dans un flacon en verre ombrés bien fermé et conservée jusqu'à l'utilisation.



Figure 8: Séchage de *Melissa officinalis*L. (ORIGINALE, 2015).

1.2.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique a été effectué selon la méthode décrite Par (BRUNETON, 1999).

➤ 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 connaître la composition en métabolites secondaires (anthocyanes, leuco-anthocyanes, tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, glucosides, coumarines, quinones).

➤ **Méthode opératoire**

Les tests sont effectués sur la poudre, l'infusé ou la décoction.

• **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 15 min, filtré à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat est récupéré dans un flacon ombré et conservé à une basse température.

a) **Recherche des anthocyanes**

Leur identification consiste à rajouter quelques gouttes d'HCl (acide chlorhydrique 0.1N) à 5 ml d'infusés. La réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.

b) a) **Recherche des tanins**

A 5 ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'une solution de $F_e Cl_3$ à 5%.

La réaction donne une coloration bleue noire en présence des tanins. (DAHON, 2003).

1. **Tanins catéchiques** 15 ml d'infusé sont additionnés à 7 ml de réactif de Stiany. La réaction donne une coloration rouge en présence tanins catéchiques.

2. **Tanins gallique**

A 5 ml d'infusé rajouter 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de $F_e C_{13}$.

La réaction donne une coloration bleue foncé en présence des tanins gallique.

c) **Recherche des quinones libres**

2 g de poudre végétale humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique N, sont mis en contact pendant 3 heures dans 20 ml de chloroforme, puis filtrer. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque $\frac{1}{2}$. Formation d'une coloration rouge en présence des quinones libres.

d) **Recherche des saponosides**

A 2 ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'acétate de plomb.

La formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

e) **Recherche des alcaloïdes**

Faire macérer 5 g de poudre végétale humectés avec l'ammoniaque ($\frac{1}{2}$) pendant 24 heures dans 50 ml d'un mélange éther chloroforme (3/1). Le filtrat est épuisé par l'Acide chlorhydrique 2N.

Des réactions de précipitations sont effectuées sur la solution chlorhydrique. En présence d'alcaloïde, le réactif de Dragendorff donne un précipité rouge (KONKON et al, 2006).

f) Recherche des flavonoïdes

A 5 ml d'infusé additionner 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'Alcool isomylique. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

g) Recherche des glucosides

A 2 g de poudre végétale rajouter quelques gouttes de H₂SO₄.

La formation d'une coloration rouge brique en suite violette indique la présence des glucosides.

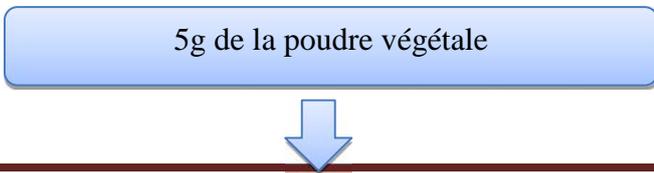
1.2.4. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux a été effectuée selon le protocole **d'OWEN et JOHNS (1999)**.

➤ Protocole expérimental (Figure9)

L'extraction se fait par l'agitation de 5g de la poudre des feuilles dans 100 ml d'éthanol 70° pendant 24h à l'aide d'un agitateur. Par la suite la solution est filtrée sur papier Wattman. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite à 60°C au rotavapore enfin L'extrait sec obtenu est récupéré par 5 ml de méthanol et conservé à 4°C.

5g de la poudre végétale



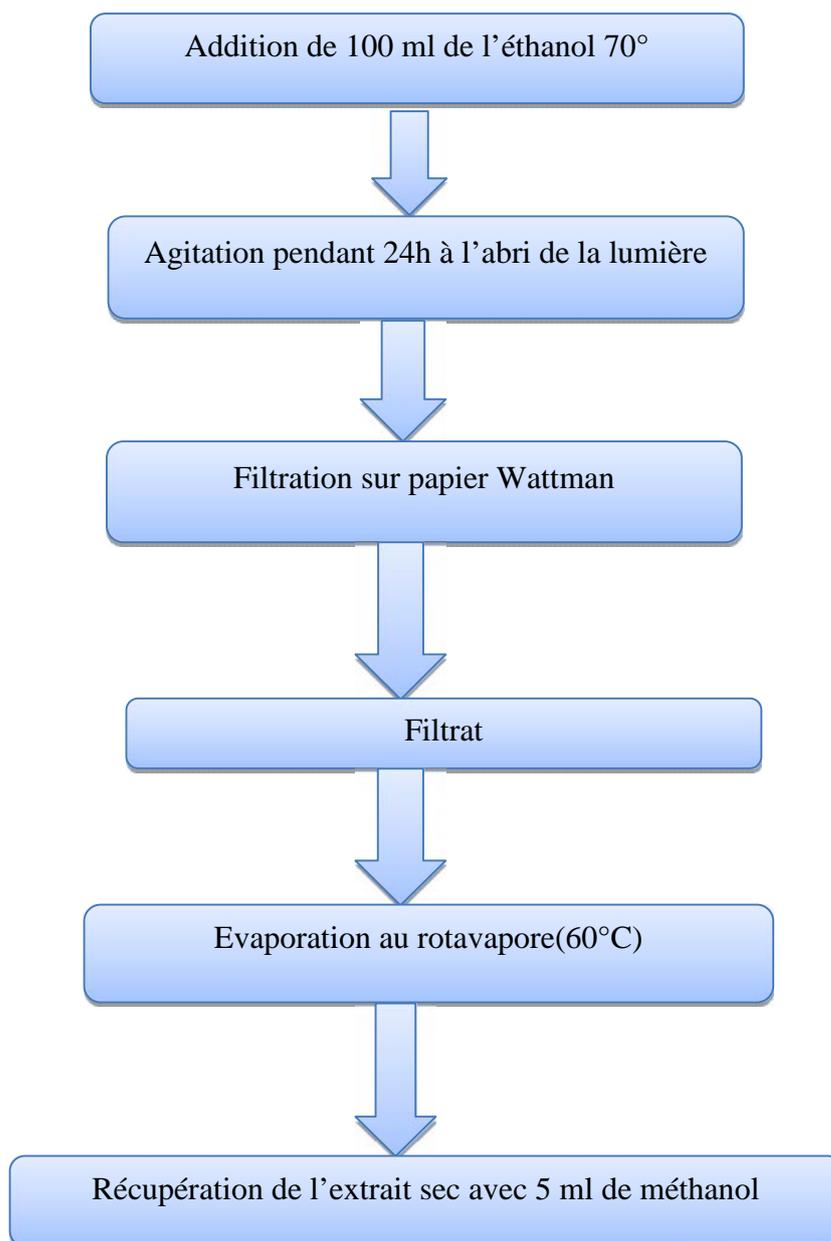


Figure9 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux (OWEN et JOHNS, 1999).

➤ **Détermination du rendement des polyphénols totaux**

C'est la quantité des composés ou substances pouvant être extraite par un solvant typique dans des conditions spécifiques (DIALLO, 2005).

Le rendement (**R%**) est déterminé par la formule suivante :

$$\mathbf{R\% = (P - P_0 / P_t) \times 100}$$

Avec :

P : poids en gramme du ballon avec l'extrait sec.

P₀ : poids en gramme du ballon vide.

P_t : poids en gramme de la poudre végétale utilisée.

1.2.5. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999).

• Principe

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès **1965** par **SINGLETON ET ROSSI**. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃MPO₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**BOIZOT ET CHARPENTIER, 2006**).

• Mode opératoire

100µl de l'extrait brut méthanolique sont mélangés à 200µl du réactif de Folin-ciocalteu et 3.16 ml de l'eau distillée. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite 600µl de la solution carbonate de sodium (Na₂Co₃) anhydre à 20% sont ajoutés au mélange. Les composés phénoliques totaux sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 765 nm. On prépare dans les mêmes conditions un blanc avec de l'eau distillée à la place de la solution de l'extrait brut. La quantification est faite selon une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique préparé à différentes dilutions allant de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200µg/ml, 250µg/ml. Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique par ml d'extrait.

• Préparation des solutions étalons

Les solutions étalons ont été préparées à partir d'une solution mère d'acide gallique dosée à 5mg /ml .Dans un ballon jaugé de 100 ml, 0.5 g d'acide gallique ont été dissous dans 10 ml d'éthanol puis le volume a été complété avec de l'eau distillée. La première dilution est préparée en prélevant 1ml de la solution mère et en complétant le volume au 10ml avec l'éthanol on répète la même opération pour la deuxième ,troisième ,quatrième et cinquième dilution en prélevant à chaque fois un volume de 1ml et en complétant à 10ml avec l'éthanol.

1.2.6Analyse chromatographique par HPLC

HPLC (High performance liquide chromatography) est une technique de séparation analytique et préparative des molécules d'un composé ou un mélange de composés. Pour certains HP signifié « haute pression »

•Principe

La chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.) est la technique la plus performante, utilisée pour la séparation et le dosage des produits non volatils thermo-dégradables, tels que les composés phénoliques. Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait complexe, ce qui permet l'étude des matériels végétales très variés (SALGAROLO, 2003 ; PIETTA *et al.*, 2003).

La séparation des composés dépend de leurs affinités pour deux phases non miscibles, une phase stationnaire et une phase mobile (solvant d'éluion) de polarités différentes (MACHEIX *et al.*, 2005).

L'échantillon à analyser est déposé au sommet de la colonne, la phase mobile entraîne sa migration suivant un gradient de solvant ou en régime isocratique. La phase mobile étant alors de composition constante (LAURANSON, 1989).

•Mode opératoire

Les extraits ont été filtrés avant injection. L'analyse a été effectuée par un appareil HPLC de type Agilent 1260, munie d'un détecteur à barrette de diodes (DAD : Diode Array Detectors). La colonne utilisée est une colonne en gel de silice de type C18 (250mm, 4.6mm, 5µm). La phase mobile consiste en deux phases : solvant A : 0.2% Acide acétique, solvant B : Acétonitril. Les composés phénoliques ont été élués à un volume de 5µl avec un débit de 1 ml/min à une température de 22± 0.8°C. La durée de l'éluion est de 30 minutes avec A : 95% et 5% du solvant B. trois longueur d'ondes ont été choisies : =270 nm, =320 nm, et =370 nm.

Des standards ont été injectés dans les mêmes conditions expérimentales. Ils permettent l'identification des pics des composés phénoliques en comparant les temps de rétention.

1.2.7. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par la technique d'Hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger(**CLEVINGER, 1928**) selon les recommandations de la **PHARMACOPEE EUROPEENE (2002)**.

➤ **Mode opératoire**

Au cours de chaque essai, la matière végétale (60g) est immergée dans 500ml d'eau distillée dans un ballon de 1 litre. On fait adapter au ballon l'appareil de condensation. L'eau de ballon est portée à l'ébullition par un chauffe ballon électrique. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles se condensent et se liquéfient à leur arrivée au niveau du réfrigérant. Le distillat (huile essentielle au-dessus, et l'eau aromatique au-dessous) est recueilli dans le tube gradué qui se termine par une ampoule, cette dernière est munie, à sa base, d'un robinet à partir duquel on pourra récupérer notre fraction d'huile essentielle, en ouvrant le robinet pour récupérer notre fraction d'huile essentielle. On récupère l'eau aromatique (l'hydrolat) dans un erlenmeyer et l'HE dans un Eppendorff, par simple différence de densité (**HELLLAL, 2011**). L'extraction dure environ 2 heures.

Trois répétitions ont été réalisées afin de déterminer le rendement en huile essentielle (volume en ml).

L'huile essentielle a été stockée à une température ambiante et à l'obscurité, et elle a été couverte par un papier d'aluminium pour la préserver.

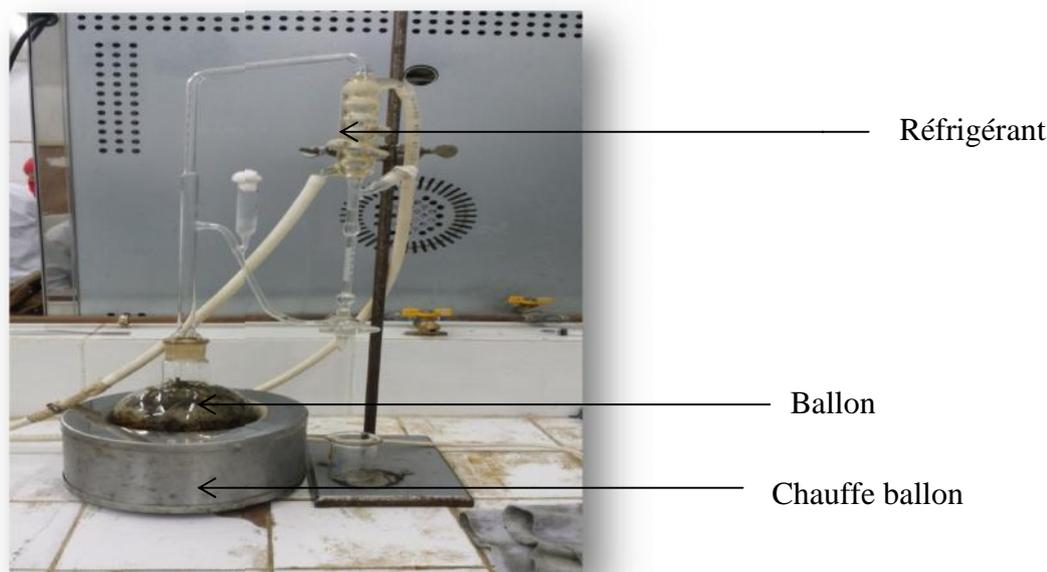


Figure 11: Montage d'extraction de l'huile essentielle des feuilles et tiges de la mélisse par hydrodistillation (dispositif Clevenger) (ORIGINALE, 2015).

❖ Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses d'huile essentielle et de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcent (%) et calculé par la formule :

$$R(\%) = (V/M) \cdot 100$$

Où :

R: Rendement des huiles essentielles en(ml) par apport à 100g de matière sèche (%)

V : Volume d'huile essentielle (ml)

M: Masse de la matière végétale séchéeutilisé (g) par apport à la matière sèche.

Durant les extractions, nous avons exploré la cinétique d'extraction en effectuant des prélèvements horaires à intervalles réguliers sur les phases organiques.

❖ Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues ont fait l'objet d'observations des caractéristiques organoleptiques : aspect, couleur, odeur.

1.2.8. Activités biologiques

1.2.8.1. Activité antioxydante de l'extrait des polyphénols totaux de *Melissa officinalis* L.

Pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols des feuilles de *Melissa officinalis* L. nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (figure12) selon le protocole décrit par **BENHAMMOU et al.,(2009)**.

• Principe

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**MOLYNEUX, 2004**).

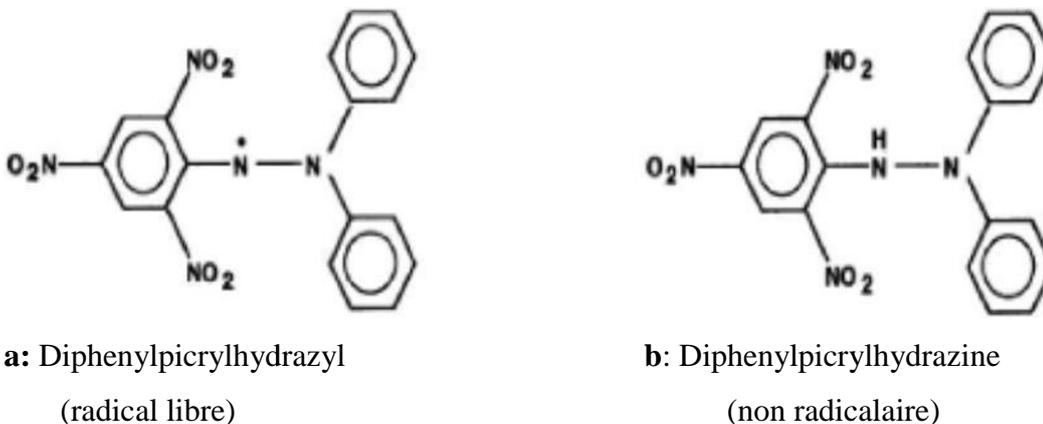


Figure 12 : Forme libre et réduite du DPPH (**MOLYNEUX, 2004**).

• Préparation de la solution DPPH

Une solution de DPPH est préparée en ajoutant 100ml du méthanol à 4mg de poudre de DPPH, la solution obtenue est de couleur violette.

• Préparation des dilutions

5 dilutions ont été préparées l'extrait des polyphénols totaux. Nous avons prélevé 1ml de la solution mère à laquelle nous avons rajouté 10 ml de méthanol (dilution1), de cette dernière, nous avons prélevé 1ml que nous avons dilué dans 10 ml de méthanol(dilution 2) et ainsi de suite jusqu'à la cinquième dilution.

➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essais, nous avons introduit 100µl de chaque dilution et 2 ml de la solution méthanolique de DPPH (4mg/100ml). En parallèle, deux témoins sont préparés,

un témoin négatif composé de 100µl de méthanol+ 2 ml de la solution de DPPH et un témoin positif, composé de 3mg de poudre d'acide ascorbique dissous dans 1 ml de méthanol. A partir de cette solution 5 dilutions sont préparées en prélevant à chaque fois 1ml de tube précédent. Les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. la lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

❖ Expression des résultats

La concentration d'inhibition des radicaux libre(I) exprimé en pourcentage est calculée selon la formule suivante :

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

Avec :

Abs c : Absorbance du contrôle.

Abs d : Absorbance pour chaque dilution.

1.2.8.2. Activité antimicrobienne de *Melissa officinalis* L.

Pour cette partie nous aborderons l'étude de l'effet antimicrobien de *Melissa officinalis* L., en testant l'effet de son HE, son l'hydrolat et l'extrait des polyphénols totaux. Nous avons utilisé respectivement la méthode de l'aromatogramme (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2008**).

• Principe

L'aromatogramme est une technique microbiologique récente qui permet d'étudier, comme un antibiogramme, la sensibilité des germes à l'HE, des polyphénols et de l'hydrolat (**HELLAL, 2011**).

La méthode de diffusion sur gélose appelée aromatoigramme qui est l'équivalent de l'antibiogramme ou les antibiotiques sont remplacés par les extraits. La méthode consiste à utiliser des disques imprégnés d'HE, d'hydrolat ou d'extrait des polyphénols et à les déposer à la surface de la géloseensemencée.

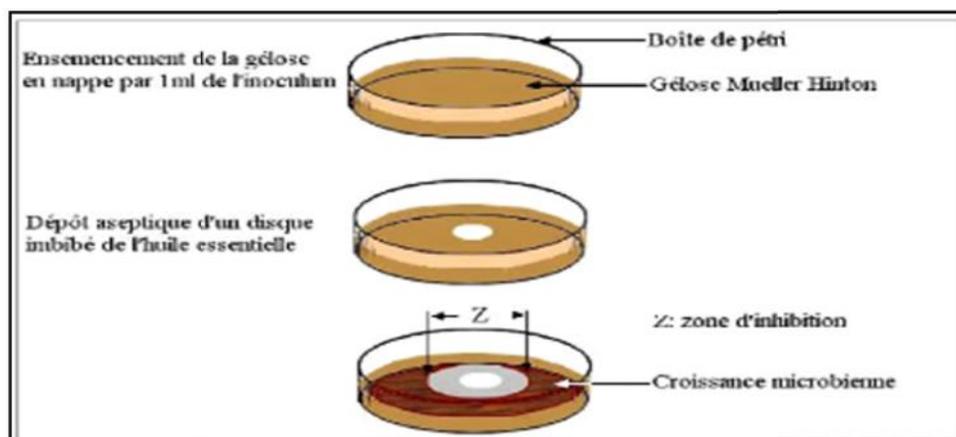


Figure 13: la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétrie (PIBIRI, 2006).

➤ **Mode opératoire**

Dans cette partie nous aborderons l'étude de l'effet antimicrobien de la plante, en testant l'effet de son HE, de l'HA, et celui de l'extrait des polyphénols totaux.

Cette technique s'effectue dans des conditions aseptiques, devant un bec bunsen pour éviter la contamination des milieux ou du matériel.

• **Préparation de l'inoculum**

▪ **Préparation de pré-culture**

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par un repiquage qui est réalisé dans des boîtes de pétries contenant de la gélose nutritive pour les bactéries puis incubées à 37°C pendant 24h.

▪ **Préparation de la suspension bactérienne**

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18heures, les mettre ensuite dans des tubes stériles à vis contenant 5 ml d'eau physiologiques (NA cl 9%), puis agiter au vortex pendant quelques secondes, pour bien disperser les amas de bactéries.

Ensuite leurs densités optiques ont été mesurées à 625 nm contre un blanc qui est l'eau physiologiques stérile grâce à un spectrophotomètre d'absorption moléculaire de type BECKMAN DU 520, la densité optique des suspensions est fixée à 0,1 qui est l'équivalent de 0,5 MC FAR land (MC FARLAND,1907).

Inoculum 01 : *Escherichia coli*.

Inoculum 02 : *Salmonella typhi*.

Inoculum 03 : *Klebsiellapneumoniae*.

Inoculum 04 : *Staphylococcus aureus*.

- **Préparation des milieux de culture**

-Le milieu de culture Muller Hinton, spécifique pour les bactéries, est fondu dans un bain Marie à 95°C.

-Sous hotte a flux laminaire, le MH fondu est coulé aseptiquement dans des boites de Pétri stériles a raison de 15 ml par boite.

- Les boites de pétri sont laissées refroidir et solidifier à température ambiante, et conserver dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

- **Ensemencement**

-Imbiber aseptiquement un écouvillon avec la suspension bactérienne.

-Essorer l'écouvillon en pressant fermement et en tournant sur la paroi interne du tube, afin de décharger le maximum.

-Ensemencer aseptiquement la boite de Pétri en frottant délicatement l'écouvillon sur la surface de la gélose en stries serrées,répéter l'opération quatre fois, en tournant la boite à 45°C de façon à croiser de stries, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Dépôt des disques**

-Prélever aseptiquement un disque stérile de papier Wattman de 6 mm de diamètre avec une pince stérile.

-Mettre en contact le bout du disque avec l'HE pure de *Melissa officinalis* L., l'hydrolat et l'extrait des polyphénols totaux, qui vont être absorbée par le disque par capillarité.

- Déposer le disque ainsi imbibé d'HE à la surface de la gélose, au centre de la boite de Pétri.

- Déposer le disque imbibé de l'extrait des polyphénols totaux, ou l'hydrolat à la surface de la gélose, en raison de deux disques par boites.

- Les boites de pétries sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 min, et mises à l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

- **Lecture des résultats**

La lecture s'effectue après l'heure d'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque.

➤ La présence d'une zone claire autour du disque signifie la présence d'une activité inhibitrice.

➤ L'absence d'une zone claire autour du disque indique l'absence d'activité inhibitrice.

- **Expression des résultats**

L'apparition d'une zone claire autour du disque appelée « zone d'inhibition » après incubation est considérée comme un résultat positif.

Selon **MEENA et SETHI (1994)**, les diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne sont classés en quatre (04) catégories :

Tableau IV : diamètres des zones d'inhibition selon le degré de sensibilité.

Degré de sensibilité des souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Souche résistante	D 10
Souche sensible	10 D 16
Très sensible	16 D 28
Extrêmement sensible	D 28

1.2.8.3. Etude de la toxicité aigüe de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. administré par voie orale.

Une toxicité aigüe est une toxicité violente et d'évolution rapide, contrairement à la toxicité chronique qui évolue lentement, et qui n'apparaît qu'après une exposition à de faibles doses ayant un effet cumulatif (**WEPIERRE, 1981**).

Selon **STELLJES (2008)**, les effets rencontrés avec la toxicité aigüe consiste généralement en mortalité et /ou morbidité.

- **Principe**

Selon **BEHRENS et KARBER (1949)**, il consiste à déterminer la dose moyenne qui provoque la mortalité de la moitié des animaux testés (DL50).

Notre étude toxicologique a consisté à déterminer la dose létale médiane (DL50), qui est par définition la dose d'un toxique provoquant la mortalité de 50% dans une population d'une espèce déterminée après un temps d'application donné (**LAURENT et al., 2005**)

Le principe consiste en l'administration des doses croissantes du produit à analyser à plusieurs lots d'animaux répartis d'une manière homogène, les animaux de chaque lot reçoivent la même dose du produit.

L'observation des effets toxique du produit sur les animaux ainsi que le nombre de mortalité, se fait tous les jours et durant les 14 jours qui suivent l'administration.

➤ **Mode opératoire**

Le mode opératoire suivie est appliqué au laboratoire de Pharmaco-toxicologie au CRD Sidal.

Les animaux ont été maintenus à jeun la veille du Test. Nous avons utilisé 5 lots (cinq lots d'essais) contenant chacun 3 souris (mâle et femelle). Chaque lot va recevoir une dose de l'huile essentielle diluer dans l'huile de tournesol à différentes concentrations, sauf le premier lot qui ne recevra que l'huile essentielle de *Melissa officinalis*L. Le volume administré pour chaque souris est de 0,5 ml. Les doses utilisées sont : 1,2, 2,4, 4,1, 9,1, 20,7 mg/kg .Ces doses sont selon le poids corporel des souris.

Un lot témoin a été ajouté contenant 3 souris, qui recevront 0,5 ml de l'huile de tournesol (huile végétal).

Tous les essais ont été initiés le même jour avec le même matériel et dans les mêmes conditions opératoires.

Les différentes doses d'HE ont été dispersées dans de l'huile de tournesol, cette dernière est miscible avec l'HE de *Melissa officinalis*L., elle est aussi sans toxicités significative sur l'animale et même pour l'homme.

Les différentes doses ont été administrées par gavage, à l'aide d'une sonde gastrique, et en respectant la durée recommandée de 5 secondes / souris.

Les souris sont privées de nourriture pendant 2 heures après le gavage.

Les animaux sont maintenus sous observation pendant 14 jours.



Figure 14: Administration orale par gavage de l'HE de *Melissa officinalis* L.(ORIGINALE, 2015).

❖ Détermination de la DL50

Le calcul de la DL50 se fait selon la méthode de **BEHRENS et KARBBER (1949)**.

$$\mathbf{DL50 = DL100 - ab / n}$$

Considérons :

n: nombre moyen d'animaux par lot.

b: nombre des morts de deux doses successives.

a: différence entre deux doses successives.

1. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimique effectués sur la poudre et l'extrait aqueux des feuilles de *Melissa officinalis*L. sont regroupés dans le tableau V (Annexe 6).

Tableau V : Screening phytochimique des feuilles de *Melissa officinalis*L.

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

Le tableau V, montre que l'extrait aqueux et la poudre de feuilles de *Melissa officinalis*L. renferme des tanins galliques, des saponosides, des alcaloïdes et des flavonoïdes avec l'absence des anthocyanes, des tanins catéchiques, des quinones libres et des glucosides.

Ces résultats sont en accord avec ceux de (NAGHIBI et al.,2005), qui mentionne que la plante *Teucrium polium geyrii* une espèce des lamiacées de la région Tamanrasset, est riche en divers métabolites dont les flavonoïdes et les tanins. 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 (BOUZID, 2009).

2. Le rendement en polyphénols totaux

Le résultat du rendement est présenté dans le tableau suivant :

Tableau VI : Rendement des polyphénols de la mélisse.

Extrait	Rendement (%)
Polyphénols totaux	21.8%

Le rendement en polyphénols totaux obtenu à partir des feuilles de *Melissa officinalis* L. est **21.8%**, ce pourcentage est légèrement inférieur à celui obtenu par **ONDREJOVIC et al.,(2012)**, qui rapporte un rendement de **23.3%**. Cette différence pourrait être due à la technique d'extraction. En effet, **MAJHENIC et al.,(2007)**, ont rapporté que l'extraction par solvant à température élevée permet d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante.

Beaucoup de recherches montrent que l'éthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (**XIA et al.,2010 ;SAHREENet al.,2010 ; BOUZIDet al.,2011**).

D'une manière générale, le rendement en extrait sec varie d'une plante à une autre selon les paramètres de l'extraction tels que, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules de la poudre végétales et le coefficient de diffusion du solvant.

3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 15 et les résultats de dosage des polyphénols sont déterminés à partir de la droite de la courbe d'étalonnage.

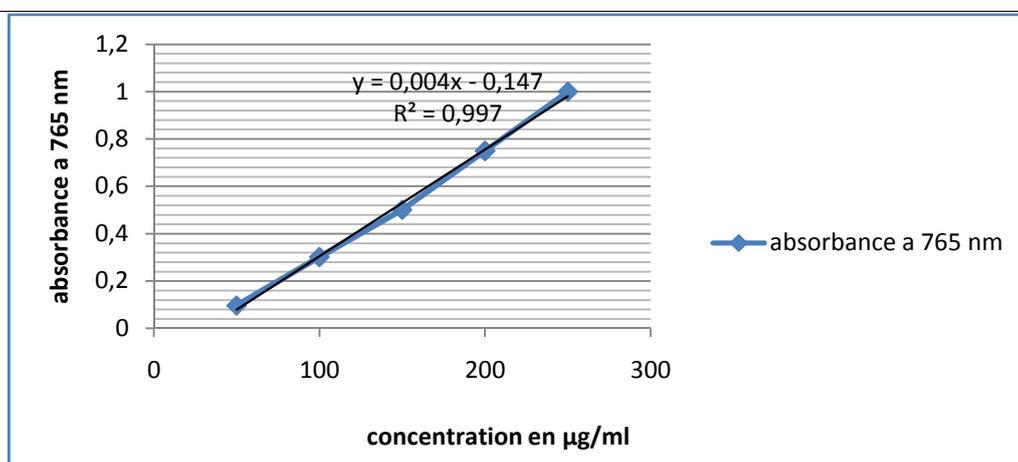


Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait phénolique (**mg EAG/g**), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Lamélisse présente un titre de **1.2535 mg EAG/g** d'extrait sec ethanologique de la plante. En l'absence de résultats bibliographiques sur la mélisse nous avons comparé nos résultats aux travaux de **MUCHUWETI et al., (2007)** qui ont estimé la teneur des polyphénols totaux du romarin (une espèce de même famille) à 10,83 mg EAG/g extrait sec du romarin. D'autre part le *Thymus vulgaris* présente une teneur de $9,07 \pm 0.002$ mg EAT/g d'extrait sec de la plante.

En effet, la teneur en polyphénols totaux n'est pas stable et se diffère d'une plante à une autre même entre les espèces du même genre (**DEHAK, 2013**). Ceci pourrait être attribués aux différences de polarité des solvants, aux techniques d'extraction et aussi bien à d'autres facteurs environnementaux tels que le climat, l'exposition au soleil et la composition du sol, qui peut changer le métabolisme phénolique des plantes (**CHAN, 2011**).

De façon générale, le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué aux (**DEHAK, 2013**) :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies.....etc.
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante.
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux.

4. Analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les résultats de l'identification chromatographique de l'extrait phénolique des feuilles de *Melissa officinalis*L., en fonction de temps de rétention, sont donnés dans les tableaux VII, VIII, IX Fi et figure 16, 17,18(Annexe 4).

Nous avons pu recenser 19 composés pour $\lambda = 270\text{nm}$, 15 composés pour $\lambda = 320\text{nm}$ et 10 composés pour $\lambda = 370\text{nm}$ dans les polyphénols totaux.

En comparant les temps de rétention des molécules à ceux des standards (annexe4), nous avons pu identifier 4 molécules pour les polyphénols totaux.

Tableau VII : principaux composés contenus dans les polyphénols en fonction du temps de rétention.

Polyphénols totaux		
Composé	Temps de rétention (min)	Teneur(%)
Non identifier	0.884	1.8199%
Non identifier	1.734	0.5747%
Ac gallique	2.572	2.7681%
Ac caféique	2.882	58.3892%
Non identifié	3.947	0.8184%
Non identifié	4.048	1.0500%
Rutine	9.242	14.2157%
Vanilline	10.291	42.2502%
Non identifié	10.881	15.9081%
Non identifié	11.655	3.6007%
Non identifié	18.072	0.2588%
Non identifié	19.168	0.3683%
Non identifié	23.105	0.2404%
Non identifié	25.091	1.2133%
Non identifié	28.855	0.2503%
Non identifié	29.024	0.2456%
Non identifié	34.319	0.9720%

Les résultats de l'analyse chromatographique montrent la présence au niveau des polyphénols totaux les composés suivants : vanilline (42.2502%) à Tr 10.291 min, l'acide caféique, rutine (14.2157%) à Tr 9.242min et l'acide gallique (2.7681%) à Tr 2.572min. Néanmoins, d'autres composés n'ont pas pu être identifiés par manque de standards.

4. Le rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile en ml obtenu pour 100g de matière végétale sèche

L'hydrodistillation des parties aériennes séchées (tiges et feuilles) a été réalisée avec le dispositif du type « Clevenger », Cette technique d'extraction a permis d'obtenir un rendement moyen de **0.26 ml/100gMS**. Ce dernier est plus important que celui obtenu par **SADRAEI, GHANNADI et MALEKSHAHI (2003)** où l'hydrodistillation des plants de *Melissa officinalis* L. de la région de Kashan (Iran) a présenté un rendement moyen de **0,1%**.

Le rendement d'HE de *Melissa officinalis* L. récoltée en Algérie est de 0,34% (**ABDELLATIF et al., 2014**), se rapproche à celui obtenue par l'HE de *Melissa officinalis* L. récoltée à la région Hammam Melouane, cette différence peut varier d'une région à une autre.

Selon certains auteurs **ADZET et al.,(1992)** ; **MRLIANOVA et al.,(2001)** ; **MRLIANOVA et al.,(2002)** et **PATORA et al., (2003)**, 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. Ainsi, **MRLIANOVA et al., (2001)** ayant utilisé différentes populations de *la Melissa officinalis*.provenant de 17 régions Européennes et présentant deux périodes de végétation (avant et au début de floraison); le pourcentage d'huiles essentielles des feuilles, au stade avant de floraison, varie de 0,06 à 0,16% de la 1^{ère} récolte. **SARI et CEYLAN (2002)** sur 11 populations de *Melissa officinalis*.provenant de différentes 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 Bozda et de 0,067% pour la localité de Menemen.

D'autres études (**SADRAEI, GHANNADI et MALEKSHAHI, 2003**; **CARLEN et al.,2004**; **SHAHRAM, MORTEZA et KATAYOON, 2011**) ont confirmé que les fluctuations observées au niveau des rendements en huiles essentielles peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à l'implication de facteurs biotiques et abiotiques dont la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation

et le régime des vents. Enfin, **PENCHEV (2010)** impute ces changements aux méthodes d'extractions (extraction par CO₂ supercritique, Soxhlet, etc.).

4.1. La cinétique d'extraction des HE lors de l'hydrodistillation

La quantité d'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. (ml) recueillie par l'essencier (type Clévenger) a été suivie durant deux heures (120 mn), l'évolution des quantités d'huile essentielle est représentée dans (figure 19).

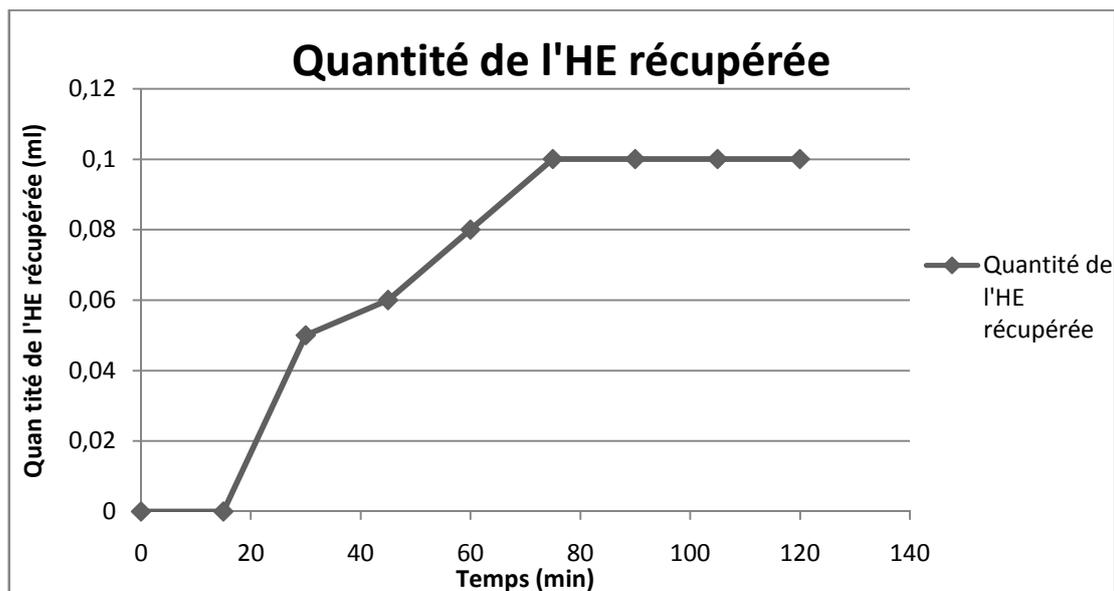


Figure 19: Cinétique d'extraction des HE lors de l'hydrodistillation.

La cinétique d'extraction d'HE peut se diviser en trois étapes qui s'expliquent comme suit

- Dans une 1^{ère} étape, nous observons un palier dont le rendement est nul (0-15 mn). Il correspond à la phase de chauffage de la matière végétale.

- la seconde correspond à une augmentation rapide de la quantité en HE (20-90 mn). Où la quantité d'HE atteint jusqu'à **0,1ml**.

- Au cours de la troisième étape, la courbe tend vers un second palier. Celui-ci correspond au rendement maximum possible à atteindre. Le temps de l'hydrodistillation (2 heures) peut être expliqué par la localisation des structures sécrétrices de l'HE chez *Melissa officinalis* L. qui sont des cellules épidermiques différenciées en glandes sécrétrices sur la tige et les feuilles recouvertes d'une cuticule. Au fur et mesure de la sécrétion des huiles par les cellules, celles-ci sont accumulées sous la cuticule. Les huiles vont d'abord être diffusées à travers l'épaisseur des cellules et du tissu végétal avant d'entrer en contact avec

la vapeur d'eau. Elles seront alors lentement entraînées durant les 120 mn comme cela a été signalé par **GILLY (2005)**.

4.2. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de *Melissa officinalis*L.

L'hydrodistillation nous a permis d'obtenir une HE dont les caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur) sont consignés dans le tableau X.

Tableau X : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de *Melissa officinalis*.

Bulletin d'analyse d'HE de laboratoire Florame (2008)		BARDEAU (1976).	Nos huiles
Aspect	Liquide limpide, mobile	--	Liquide, mobile
Couleur	Jaune	Incolore à faiblement jaunâtre	Jaune
Odeur	Odeur caractéristique	Très fine et agréable de citron	Citronnée



Figure 20 : L'huile essentielle de *Melissa officinalis*L.

Les caractéristiques organoleptiques de notre huile essentielle obtenue par hydrodistillation présente un liquide, mobile, de couleur jaune dégageant une odeur citronnée. Ces résultats sont comparables à celles données par (**BARDEAU, 1976**) et par le Bulletin d'analyse du laboratoire (**FLORAME, 2008**) de *Melissa officinalis*L.

6. Activités biologiques

6.1. Activité antioxydante

Les résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait de polyphénols totaux des feuilles de *Melissa officinalis* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH sont illustrés dans la figure 21 et le tableau XII.

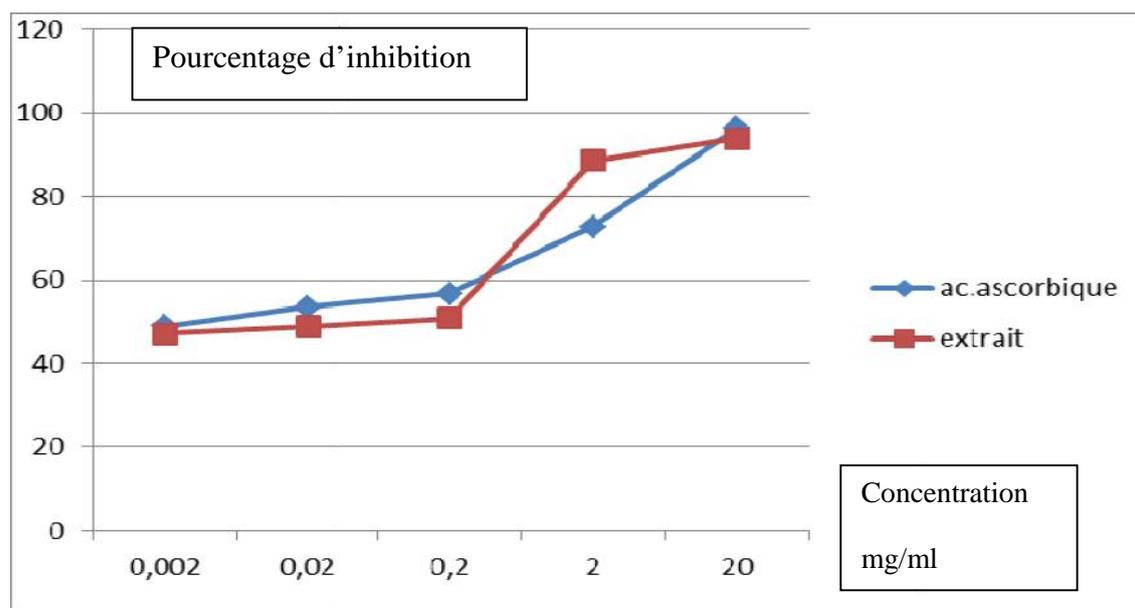


Figure 21. Pourcentage d'inhibition pour les polyphénols totaux et l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations.

D'après ces résultats, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les polyphénols totaux des feuilles de la mélisse ont montré une activité importante, avec un pouvoir d'inhibition de **93.82%**, en comparant avec l'acide ascorbique dont le pourcentage d'inhibition est de **96.82%** pour la concentration de **20mg /ml**.

Les IC₅₀ calculés pour nos échantillons sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XII : Les IC₅₀ l'acide ascorbique et l'extrait phénolique testé.

Extraits	Acide ascorbique	Polyphénols totaux
IC ₅₀ (mg/ml)	0.006	0.006

D'après les résultats du tableau XII, les polyphénols totaux montrent une activité antioxydante intéressante avec une IC₅₀ de l'ordre **0.006mg/ml**, par rapport l'acide ascorbique qui a montré une IC₅₀ de l'ordre **0.006mg/ml**. Donc on peut dire que l'activité antioxydante des polyphénols est comparable à celle de l'acide ascorbique.

Nos résultats indiquent que les polyphénols totaux présentent une activité remarquable vis-à-vis du DPPH avec un pourcentage de **93.82%** pour une concentration de **20 mg/ml**. Ceci concorde avec les résultats d'**ONDREJOVIC et al(2012)**, obtenus à partir

de l'extrait des polyphénols de la même partie de la mélisse qui a montré une activité antioxydante avec un pourcentage de **50.2%** à une concentration de **13mg/ml**.

Les composés phénoliques sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydante ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (JAVANOVIC *et al.*, 1994).

Globalement, les résultats obtenus par piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que les polyphénols totaux de mélisse présentent un pouvoir d'inhibition très important, cela est probablement lié à la composition de l'extrait phénolique riche en tanins et en flavonoïdes démontré par le screening phytochimique et aussi à la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (VERMERRIS *et* NICHOLSON, 2006).

6.2. Activité antimicrobienne de *Melissa officinalis* L.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions et du développement de différentes souches par les extraits de *Melissa officinalis* L. sont regroupés dans le tableau XIII et les figures (1, 2, 3, 4, 5, 6) (Annexe 2)

Tableau XIII : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différentes souches bactériennes.

Les diamètres des disques (6 mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone

	HE		HA		PPT	
	DZI	Interprétation	DZI	Interprétation	DZI	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus.</i>	33	Extrêmement Sensible	0	Résistante	0	Résistante
<i>Escherichia coli</i>	11	Sensible	0	Résistante	0	Résistante
<i>Salmonella typhi.</i>	15	Sensible	0	Résistante	0	Résistante
<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	12	Sensible	0	Résistante	0	Résistante

d'inhibition

(0) Résistant, (+) Sensible, (++) Assez sensible, (+++) Extrêmement sensible.

Les résultats obtenus, montrent que la variation de l'activité antibactérienne de l'HE, testée est en fonction de la bactérie cible. Il s'est avéré aussi qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée pour l'hydrolat et les PPT (Annexe 2).

Il est à noter que l'activité antimicrobienne de l'HE la plus élevée a été enregistrée dans le cas de *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre d'inhibition supérieure à (**30 mm**). Par contre l'HE de *Melissa officinalis*L. est moins active sur *Salmonella typhi*.(**15 cm**) et *Klebsiellapneumoniae*. (**12mm**). En revanche la souche *Escherichia coli*. a manifesté la plus faible sensibilité avec un diamètre de (**11mm**)(Annexe 2). RAMENER JURY

Concernant l'HA et les EPPT, nous remarquons qu'aucune zone d'inhibition n'apparaît avec *Staphylococcus aureus*.*Salmonella typhi*.*Klebsiellapneumoniae*.et*Escherichia coli*(Annexe 2), donc nous pouvons conclure que l'HA et les EPPT de *Melissa officinalis*L. n'ont aucun effet inhibiteur sur ces souches bactériennes.

Ces résultats corroborent par les études de **FEKNOUS (2012)** sur l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et l'HA de la *Melissa officinalis*L., de la région de Hammam Melouane qui n'a aucun effet sur ces souches bactériennes et l'hydrolat qui a un effet positif sur *Staphylococcus aureus*.et négatif sur *Klebseilla pneumoniae*.et *Escherichia coli*. Donc nos résultats se rapprochent de celle de **FEKONOUS (2010)** à l'exception de la souche *staphyloccusaureus*.

Pour l'HE, Nos résultats se rapprochent aussi avec ceux obtenus par**AMMOUR (2011)**, et **FEKNOUS(2010)** qui ont travaillé sur l'HE de la mélisse de Hammam Melouane et qui ont obtenue presque les mêmes résultats que les notres. Plus particulièrement l'étude de **FEKNOUS (2010)** a dégagé des résultats concernant les zones d'inhibitions de l'HE de *Melissa officinalis* L. montrantque cette dernière à une forte action inhibitrice sur *Staphylococcus aureus*.et elle a une faible action sur la souche *Escherichia coli*, mais elle n'a aucune action inhibitrice sur *Klebseilla pneumoniae*(0mm).Donc nos résultats se rapproches a ces résultats.

Nos résultats rapprochent aux résultats de **ABDELATIF et al.,(2014)** qui ont travaillé sur l'HE de *Melissa officinalis* L. récoltée en Algérie.

Les résultats obtenusrévèlent que les bactéries Gram (+) sontles plus sensibles. En effet, la bactérie Gram (+) a manifesté une sensibilité très importante vis-à-visde l'action inhibitrice de l'HE avec un diamètre de (**33 mm**) d'inhibition, alors que les bactéries Gram(-) ont présentés des faibles sensibilités avec des diamètres d'inhibitions de(**11et 12 mm**).

Ces résultats sont confirmés par les résultats de **FARAG et al., (1989)** ; **MARINO et al., (1999)** et **INOUYE et al., (2001)** qui ont prouvés que les bactéries Gram(+) sont généralement plus sensible aux HE que les bactéries Gram (-).

En outre, l'activité antimicrobienne de l'HE de *Melissa officinalis* L.a montré une sensibilité très importante chez la bactérie à gram(+) (*Staphylococcus aureus.*) par rapport aux bactéries à gram (-) (*Salmonella typhi. Escherichia coli.* et *Kleibseilla pneumonia.*) qui ont montré des faibles sensibilités aux HE testés. Ceci peut être expliqué par la présence d'une résistance intrinsèque aux agents biocides (**GILLES et ZHAO, 2010**). Cette résistance est en relation avec la nature de la membrane externe qui est composée de lipopolysaccharides. Ces derniers forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes (**PRESCOTT et al., 2003**).

Selon **LARRONDO et al.,(1995)** qui ont étudiées l'activité de l'HE de *Melissa officinalis* .vis-à-vis plusieurs bactéries, et qui ont prouvés la sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles de la mélisse. Cette sensibilité est principalement en fonction de la composition chimique des huiles essentielles et de la nature de leurs composés volatiles (**CAILLET et LACROIX, 2007**).

Selon **DORMAN et DEANS (2000)** les composés chimiques purs les plus efficaces sont le Géraniol, le Citronellal. Cela était démontrés par une étude de **ANICIC et al., (2005)** qui a prouvais que le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. sur plusieurs bactéries est dû aux principaux constituants de l'HE *Melissa officinalis* L. qui étaient géranol (17,30%), le néral (14,70%) et le citronellal (10,70%).

Cependant un fait saillant de **ABDELATIF et al.,(2014)** sur l'action inhibitrice de l'HE de *Melissa officinalis* L. sur *Staphylococcus aureus.*, *Escherichia coli* et *Kleibseilapneumoniae.* est due à la forte teneur de cette HE en citral, en outre l'effet de l'HE sur *Salmonella typhi.* est dû au citronellal.

L'ensemble des composés chimiques présents dans l'HE augmente l'activité bactéricide du Géraniol contre les souches bactériennes agissant en synergie (**BOUKHETEM, 2010**).

6.3. Résultats de l'étude de la toxicité aigüe de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. administré par voie orale

L'étude de la toxicité aigüe a été effectuée selon le protocole décrit par **BEHRENS** et **KARBER (1949)**. Les résultats de l'étude de la toxicité aigüe sont illustrés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Résultat de la toxicité aigüe de l'HE de *Melissa officinalis L.* administrée par voie orale.

N° de lot	Dose(mg/kg)	Nombre d'animaux par lot	Nombre de mortalité	Pourcentage de mortalité (%)	Autres signes de toxicité
1 (témoin)	Huile végétale	3	0	0 %	Aucun
2	1,2	3	0	0%	Aucun
3	2,4	3	0	0%	Aucun
4	4,1	3	1	33,33%	Faiblesse
5	9,1	3	3	100%	Ataxie Faiblesse Troubles comportementaux
6	20,7	3	3	100%	Ataxie Faiblesse Troublescomportementaux

La dose létale (DL50) a été calculée grâce à la courbe.

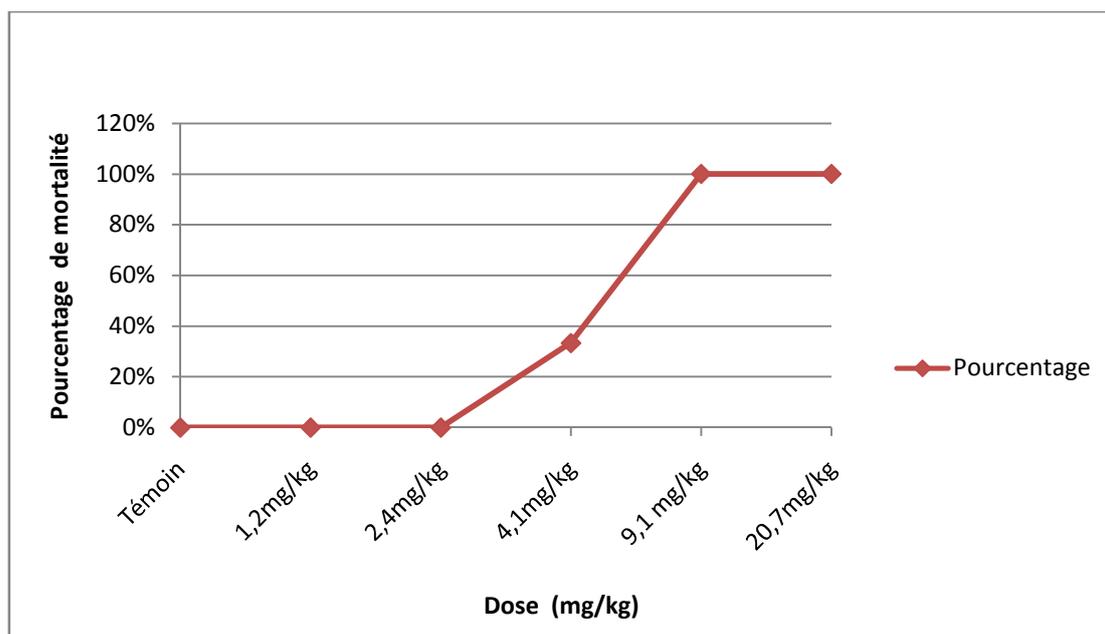


Figure 22: Pourcentage de mortalité en fonction des doses administrées.

Après 2h de l'administration de différentes doses d'HE, aucune mortalité immédiate n'a été observée pour toutes les souris des six lots testés.

Nous n'avons observé aucun signe de mortalités sur les trois souris du lot témoin, car l'huile de tournesol (huile végétal) n'a aucun effet nocif.

Durant les 14 jours d'observation des souris traités par l'HE de *Melissa officinalis* L. à des doses 1,2mg/kg, 2,4mg/kg, 4,1mg/kg, 9,1mg/kg et 20,7 mg/kg, nous avons remarqué une augmentation du taux de mortalités respectivement de 0%, 0%, 0%, 33,33%, 100% et 100%, respectivement aux intervalles de 3^{ème} jour, entre 2^{ème} et 3^{ème} jour, 2^{ème} jour.

Nous constatons aussi qu'il y a une proportionnalité très nette entre la dose administrée et le taux de mortalité observée. Plus la dose est grande, plus elle est toxique, c'est le cas des trois dernières doses 4,1 mg/kg, 9,1 mg/kg et 20,7 mg/kg, où les taux de mortalités augmente selon les doses administrés.

Pendant les 14 jours d'expérimentation, nous avons remarqué et notés les signes comportementaux qui agissent sur le système nerveux des souris :

- L'administration de l'huile essentielle à la dose de 1,2 mg/kg et 2,4 mg/kg ne fait apparaître aucun signe pendant les 14 jours de traitement.
- L'administration de l'huile essentielle à la dose de 4,1 mg/kg provoque une faiblesse très prononcée suivie de la mort d'une des souris sur trois au troisième jour. Après 5 jours le retour à l'état normal pour les deux autres souris est observé.
- A la dose de 9,1 mg/kg, nous avons remarqué une Ataxie, une forte faiblesse et des troubles comportementaux des souris. Aucune mortalité n'a été observée pendant les deux premières heures. Après 12 heures, deux souris décèdent, Puis 48 heures après la troisième souris décède.
- Enfin à la dose de 20,7 mg/kg de l'huile essentielle, les souris étaient très faibles, avec une ataxie générale très remarquable. Après 24 heures toutes les souris ont décédé.

Selon l'échelle de **HODGE et STERBER (1995)**, la dose létale de l'HE de *Melissa officinalis*L. déterminé graphiquement est égale à 5,5 mg/kg.

Nous avons révélé que l'HE de *Melissa officinalis*L. a présenté une toxicité sur les souris N.M.R.I, pour les doses 4,1, 9,1 mg/kg et 20,7 mg/kg. En outre cette HE n'est pas toxique pour les faibles doses telles que 1,2 et 2,4 mg/kg. Ces résultats permettent de connaître les doses de toxicité de l'HE *Melissa officinalis*L., afin d'établir les limites d'utilisation thérapeutique.

Vue l'absence des travaux sur la toxicité de HE de *Melissa officinalis* L. par voie orale. Nous avons comparés nos résultats à ceux de **BRUNETON (2009)** qui a étudié la DL₅₀ des lamiacées.

Selon **BRUNETON (2009)** la DL₅₀ de la lavande (*Lavandula officinalis*L.) est 6,2 mg/kg pour les rats. Nous pouvons comparer le résultat de cette lamiacée avec l'autre. La DL₅₀ de l'HE de *Melissa officinalis*L. de la région de Hammam Melouane est de 5,5 mg/kg pour les souris de race N.M.R.I, cette dose n'est pas standard pour toutes les races de souris.

La faible différence entre les résultats peut être, elle est due aux animaux qui sont différents.

D'autre part le fournisseur Américain MSDS NATURAL SOURCING (2007), mentionne que la DL50 de l'HE de *Melissa officinalis*L. par voie oral est 5 mg/kg pour les rats, selon plusieurs auteurs cette différence peut varier selon différents facteurs.

D'après VAULLOURDOLLE (2007), la DL50 est soumise à de multiples facteurs de variations : certains sont liés à l'animal comme l'espèce, l'âge, le sexe, le poids, la pathologie spontanée et la voie d'administration, la concentration de la substance la vitesse d'injection, la température ambiante, les conditions d'hébergements des animaux, l'éclairage, le stress et l'heure d'administration.

D'après COUDERC (2001), l'HE du thym (*Thymus vulgaris*L.) et la lavande (*Lavandula officinalis* L.) n'ayant pas la réputation d'être très toxiques sur les animaux, mais selon certains auteurs THORUP et al.,(1983) ; SULLIVAN et al.,(1979) ; KNIGHT et al., (1994) et LIS BALCHIN,(1999),l'HE contenant les terpènes sont toxiques chez les animaux. La toxicité de l'HE de *Melissa officinalis* L. peut- être due à sa richesse en terpènes.

La recherche de nouvelles plantes aromatiques à caractère thérapeutique a surtout servi à montrer le bien fondé de leurs utilisations par les praticiens traditionnels. 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.

Au terme de ce modeste travail que nous avons mené, il est nécessaire de rappeler les principaux résultats obtenus.

Le screening phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser des flavonoïdes, saponosides, des tanins galliques et quelque trace d'alcaloïdes au niveau des feuilles de la mélisse. Ces métabolites secondaires ont une grande valeur thérapeutique.

L'extraction solide-liquide a permis d'obtenir un rendement de 21.8% pour les polyphénols totaux. L'estimation quantitative de l'extrait phénolique des feuilles de *Melissa officinalis* L. a montré une concentration de 200 mg EAG/g. Le dosage de cet extrait a présenté une teneur de 1.2535mg EAG /g

L'analyse qualitative chromatographique des extraits phénoliques par HPLC a révélé la présence de la vanilline (27.9926%), l'acide caféique (24.6381%), rutine (10.8544%) et l'acide gallique (2.7681%) au niveau des polyphénols totaux.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, nous a permis de séparer et de quantifier les molécules volatiles et non volatiles. Nous avons obtenu un rendement de 0,26 % en huile essentielle à des propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie.

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse est une technique qui nous a permis d'identifier la composition chimique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. En effet, elle a permis d'identifier la composition moléculaire de l'extrait volatile de la plante qui est composé essentiellement des alcools, des alcanes et d'esters.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH a montré que les extraits testés sont pourvus d'un pouvoir antioxydant élevé avec des pourcentages de réduction du

DPPH de 93.82% pour les polyphénols totaux en comparaison avec produit de référence, l'acide ascorbique qui a montré une réduction de 96.82%.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélosé a montré que l'huile essentielle testé de *Melissa officinalis* L. a une action inhibitrice très importante sur les bactéries à Gram (+) par rapport que les bactéries Gram (-) qui sont résistant. . Cette HE est fortement inhibitrice pour *Staphylococcus aureus* (ZI=33mm), et modérément inhibitrice pour *Salmonella typhi*.(ZI=15mm) .Par contre, elle est légèrement inhibitrice pour *Klebsiella pneumoniae*. et *Escherichia coli*. (ZI= 12mm et 11mm).

Concernant l'extrait des polyphénols totaux et l'hydrolat du *Melissa officinalis*L., nous avons constaté qu'ils n'ont aucun effet inhibiteur pour toutes les souches bactériennes.

L'étude de la toxicité aiguë de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*L. administré par voie orale, nous a permis de connaître la DL50 de cette HE qui est 5,5 mg/kg.

L'ensemble des résultats obtenus constitue une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives.

En perspective, les résultats de cette étude font appel à d'autres recherches :

- ✓ La réalisation de la culture de cette plante pour une exploitation à grande échelle.
- ✓ Il serait intéressant, lors de l'hydro distillation de récupérer l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel pharmacologique, car elles n'ont pas fait l'objet d'études scientifiques approfondies. Ces eaux aromatiques constitueraient un créneau de recherche intéressant pour leur exploitation en cosmétologie.
- ✓ Prospector d'autres méthodes d'extraction (extraction par solvant, extraction par CO2 supercritique...) pour un meilleur rendement.
- ✓ Nous proposons de finaliser l'analyse chromatographique par utilisation d'autre technique dans le but de déterminer avec précision les différents composés de l'huile essentielle de la mélisse, pour identifier les principes actifs qui interviennent dans ces activités pharmacologiques et doser des différents constituants chimiques.
- ✓ Réaliser les tests de toxicité subaiguë (DL100) par la détermination de la toxicité de l'huile essentielle.

- 1-ABDELATIF F ., BOUDJELLA H ., ZITOUNI A ., HASSANI A, 2014 :**Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves for Algerian *Melissa officinalis* L. EXCLI Journal. 13, 772- 778pp.
- 2-ADINEE J ., PIRI K & KARAMI O, 2008:** Essential Oil Component in Flower of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4(3): (ISSN 1553-3468). 277-278 pp
- 3- ADZET T ., PONZ R ., WOLF E et SCHULTE E, 1992 :** Content and composition of *Melissa officinalis* oil in relation to leaf position and harvest time. *Planta Med.*, 58: 562-564 pp.
- 4-AFNOR, 2000 :**Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6ème édition. AFNOR, Paris.
- 5-AGANGA A ., MOSASE K , 2001:**Tannins content nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphium mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*. 91 :107pp.
- 6-ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 1998 :** An ordinal classification for the families of flowering plants, *Annals of the Missouri Botanical Garden*; Vol. 85, No. 531-553pp.
- 7-AIT YOUSSEF M, 2006 :** Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press, Paris. 177-179 pp.
- 8- ANTON R et WICHTL M, 2003 :** Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition Tec & Doc. Paris , 692pp.
- 9-ANICC NV ., DIMITRIJE VIC S ., RISTIC MS ., PETROVIC S, 2005 :** Antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L, Lamiaceae. *Hemijiskaindusrija*, (Vol 2), 243- 247 pp.
- 10-AMMOUR S, 2011 :** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. Thèse de master. Université de BLIDA 1. Algérie. 31-42pp.
- 11-ARNAL-SCHNEBELENB et al., 2007 :** Santé Référence Phytothérapie: La santé par les plantes. Edition Sélection du Reader's Digest, S.A., Paris, 447pp.
- 12-ASTRANI A., REICHLING J., SCHNITZLER P, 2008 :** *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 734-740pp.
- 13-AUCLAIR ET COTE, 2002 :** EXTRACTION D'HUILES ESSENTIELLES DE CONIFÈRES. EXPO- journal, rapport interne, département des sciences de la nature, Cégep de saint-félicien, 11 pp.

- 14- BABA AISSA F, 1999** : Encyclopédie des plantes médicinales utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident). Edition Librairie moderne, Rouiba, Alger :368.7.60 ,161 ,189,192 pp.
- 15-BAHORUN T, 1997** : Substance naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarchcouncil, Réduit, Mauritius. 83-94 pp.
- 16-BARDEAU F, 1976** : La médecine par les fleurs. Editions Robert Laffont, S.A.440pp
- 17-BARNES, J., ANDERSON LA., PHILLIPSON JD, 2007** : HerbalMedicines.Thirdedition, Edition pharmaceuticalpress, 710 pp.
- 18-BARTELS A, 1998** : Guide des plantes du bassin méditerranéen. Edition Eugen Ulmer.400pp.
- 19-BAUDOUX D.2000** : L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles .Douce Alternative,; Biarritz (France) 6-29, 221pp.
- 20-BERNARD A., 2012.** Les épices c'est malin, cannelle clou de girofle, poivre leurs benifait et toutes leurs utilisation méconnues pour la santé, la beauté et la maison, p16.
- 21-BEHRENS B & KARBER U.G, 1949** : Toxicity on mice. Arch. Exper. Path. Université Pharmakol,177,377 pp.
- 22-BELOUED A.2001** : Plantes médicinales d'Algérie.OPU Algérie.192pp.
- 23-BENHABILES, 1995** :Comparaison des huiles essentielles de deux espèces algériennes de romarin : RosmarinusEriocalyx et RosmarinusOfficinalis Linn. extraction et études analytique. Mémoire de Magister: Génie Chimique: Alger, Ecole Nationale Polytechnique.
- 24- BENHAMMOU et al., 2009** :Antioxydantactivity of methanolicextracts and some bioactive compounds of *Atriplexhalimus*.Science direct, CR Chimie, 1261, 1265.
- 25-BIANCHINI F & CORBETTA F, 1975** : Atlas des plantes médicinales. Edition Nathan.243p.
- 26-BOCK B, 2010** : Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. Tela Botanica.
- 27-BOIZOT N ., CHARPENTIER JP, 2006** : Methode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arabe foustier. Le cahier des techniques de l'Inra, 123 pp.
- 28-BOTINEAU M.2011** : Guide des plantes médicinales, édition Belin. 246pp.

- 29-BOULARD B, 2001** : Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Edition Estem.636pp.
- 30- BOUZID.A, 2009**: Décomposition des effets de la libéralisation financière : Crises versus croissance.Tunisie.11-12pp.
- 31-BOUZID W., YAHIA M., ABDEDDAIM M., ABERKANE MC et AYACHI A, 2011** : Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de L'Aubepine Monogyne. Lebanese Science Journal, 12 (1), 59-69 pp.
- 32-BRADA J, 2007**: Eastern European Economics, M.E. Sharpe, Editor's Introduction, vol. 45(4), 3-4 pp.
- 33-BRUNTON J, 1993** :Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 623p.
- 34-BRUNETON J, 1999** :Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.3eme Edition technique et documentation, Paris. 180pp.
- 35-BRUNETON J, 2009** : Pharmacognosie. phytochimie, plantes médicinales, 4ème édition. Paris: Tec & Doc. Paris .180-288pp.
- 36-CARNAT AP et al., 1998** : The aromatic and polyphenolic composition of lemonbalm(*Melissa officinalis*L.subsp.*officinalis*) tea. Pharmaceutica Acta Helvetiae. Volume 72 , Issue 5.301-305 pp.
- 37-CAILLET S ., LACROIX M, 2007** : Les huiles essentielles, leurs propriétés antimicrobienne et leur application potentielles en alimentaire, volume 3, 1-8 pp.
- 38-CHAN SH., KHOSHABEH R., andNGUYEN TQ, 2011**: Spatio-temporal consistency in video disparity estimation, Proceedings of IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP '11). pp. 885-888 pp.
- 39-CLEVENGER JF, 1928** :Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type. American Perfumer& Essential Oil Review,467-503 pp.
- 40-CARLEN C, NEYROUD JA., CARRON CA et REY C, 2004** : Effets de différents engrais azotés organiques sur le rendement de plantes aromatiques et médicinales.
- 41-COUDREC VL, 2001** : Toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Toulouse. France.
- 42-CROTEAU R., KUTCHAN TM et LEWIS NG, 2000**: Natural products (secondary métabolites). American society of plant physiologists, 1250-1268.pp.
- 41-DACOSTA Y,2003** : Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.

- 42-DAHON, 2003** :Polarimetric Scattering and SAR Information Retrieval. EdYa-Qiu Jin,Feng Xu.215pp.
- 43-DEBUIGNE G, 1984** : petit Larousse des plantes qui guérissent, 500 plantes.Edition Larousse ; Paris, 225 pp.
- 44-DEHAK K, 2013** : Métabolites d'extraction et de séparation des substances naturelles, Polyphénols, Université KASDI MerbahOurgla, 19 p.
- 45-DELLILE L, 2007** : Plante médicinales d'Algérie, Edition BERTI, Alger, 240 pp.
- 46-DE MAACK F et SABLIER M, 1997** :Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse .Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation. 2614 PP.
- 47-DIALLO A, 2005** :Etude de la phytochimie et des activités biologiques de syzygiumguinees WILLID (MYRTACEAE). Thèse doctorat en pharmacie. Université de barmako, Mali. 80p.
- 48-DOGAN S., AYYILDIZ Y., DOGAN M., ALAN Ü., DIKEN M.E. (2013)**:Characterisation of polyphenol oxidase from*Melissaofficinalis*L. subsp. *officinalis*(**lemon balm**). Czech J. Food Sci., **31**: 156–165pp.
- 49-DORMAN HJD, DEANS SG, 2000** : Antimicrobial agents from plants: antibacterialactivity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol., 88, 308-316 pp.
- 50-ESCARPA A and GONZALEZ MC, 2001**: "Total extractable phenolic chromatographic index: an overview of the phenolic: class contents from different sources of foods", *EUR FOOD RE*, 212(4). 439-444 pp.
- 51-FARAG RS ., DAW ZW ., HEWEDI FM., ELBARAROTY GSA, 1989** : Antimicrobialactivity of someEgyptain spis Essential Oils. J. Food potects, 52:675-679pp.
- 52-FEKNOUS S ., F. SAIDI ., MOHAMED SAID R, 2012** : Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante a caractère thérapeutique *Melissa officinalis*L.Nature &Technology. A- Sciences fondamentales et Engineering, n° 11/Juin 2014. 07,13pp.
- 53-FIORUCCI S, 2006** :Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamiquemoléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 211 p.
- 54-FLERIET A., MACHEIX JJ et CHRISTIAN A, 2005**. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.

- 55-FRANCHOMME P ., JOLLOIS R ., & PENOEL D, 2001** :L'aromathérapie exactement. Editions Jollois, 103-105pp .
- 56-GILLES M., ZHAO J, 2010** : Samson Agboola M.A. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. Food Chemistry, 119: 731–737 pp.
- 57- GILLY G, 2005** : Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à Grasse (botanique- culture – chimie- production et marché).Edition L'harmattan, Paris.404pp.
- 58-GILLY G, 2007** :Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse. Edition L'Harmattan , France.414pp.
- 59-GIRRE L, 2001** : Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments, édition Delachaux et Niestlé S.A., Paris, Dépôt légal : Mars 2006, 253pp.
- 60-GOGU I., GHIORGHI ., DIANA ELENA ST., MAFTEI, DANIELA N & NICUTA, 2005**: Investigations on the in vitro morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species. Université Alexandru Ioan Cuza.Romanie.120-121pp.
- 61-GUEBAILIA AH, 2007** : Polyphénols des sarments et des rafles de la vigne (*Vitisvignifera* L.) et du vin, purification, dosage et activités biologiques. Thèse Doctorat en Chimie. Université Badjmokhtar. Annaba, 123pp.
- 62-GRUNWALD J et JANICHE, 2006** : Le guide de la phytothérapie. Edition Marabout. Paris.
- 63-GUIGNARD JL, 2000** : Biochimie végétale, Editions Masson, Paris, 2ème éditionMarsson, 281pp.
- 64-GUIGNARD JL, 2001** :Botanique systématique moléculaire .12^{ème} Edition, collection (Abrége).Marsson 210 pp.
- 65-HARBONE B,1989** : Plethora of polyphenols *Plant Phenolics*. In *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 1, London. 552 pp.
- 66-HAYON JC, 2007** : Les plantes qui nous soignent, traditions et thérapeutiques. Edition Ouest .France.
- 67-HELLAL Z, 2011** : Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites desCitrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Thèse Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.1-8-45-78 pp.
- 68-HERNANDEZ R et OCHOA L, 2005** : Substitution de solvants et matieres actives de synthèse par un combine (solvant/actif)d'origine végétale. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse,France,;32-225pp.

- 69-HODGE HC et STERNER JH, 1943** : Determination of substance acute toxicity by LD50. American Industrial Hygien Association, 10: 93pp.
- 70-HOSEIN S & ROGERS T, 2005** : Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. Edition révisée. CATIE. 60pp.
- 71-INOUE S., TAKIZWA T., et YAMAGUCHI H., 2001** : Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. J. Antimi. Chemo., Vol. 47, 565-573 pp.
- 72-ISERIN P, 1997** : Encyclopédie: Encyclopédie des plantes (médicinales : identification ; préparation). Larousse - Borda, Paris pp : 114-145-297-335pp.
- 73-JAVANOVIC SV., STEENKEN S., TOSIC M., MARJANOVIC B., SIMIC MJ, 1994**: Flavonoïds as antioxydants. Journal of American Chemical Society. 116 : 4846-4851pp.
- 74-JORG GRUNWALD et CHRISTOF JANICKE , 2007** : Guide de la phytothérapie, La thérapeutique des plantes, La santé par les plantes. Paris. 114, 230 pp.
- 75-KONKONNG., SIMAGA D., ADJOUNGOUA AL., N'GUESSAN KE., ZIRIHI, GN. et KONE BD. 2006**: Etude phytochimique de *Mitragyninermis* (Wild) OKTZE (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. Pharm. Méd. Trad. Afr., XIV:73 – 80 pp.
- 76-KOYTCHEV R., ALKEN R.G., DUNDAROV S. 1999** : Balm mint extract (Lo-701) for topical treatment of recurring herpes labialis. Phytomedicine, 6 (4), 225-30 pp.
- 77-KNIGHT MJ., HANSEN SB ., BUCK WB, 1994** : Toxicity of Melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats. Vet Human Toxicol, 2, Vol 36, 139-142pp.
- 78-LARRONDO J.V., AGUT M ., CACV- TORRAS MA , 1995** : Antimicrobial of essences from labiates Microbios, 82 (332) : 171-200 pp.
- 79- LAURANSON J, 1989**: Exploration de la diversité biochimique chez les conifères : contribution à l'étude de l'hybridation de *Pinus uncinata* x *Pinus sylvestris* et à la connaissance du complexe spécifique *Pinus nigra*. Thèse Univ. Lyon I, 245 pp.
- 80-LAURENT C., DEIDT C ., LAURANT F, 2005**. Contamination des sols. Transfert des sols vers les animaux. Edition EDP science. Paris. 214pp.
- 81-LE HIR A, 1983**: Abrégé de pharmacie galénique, 4^{ème} Edition, Masson, 97-99-101-163 pp.

- 82-LIS-BALCHIN M, 1999 :** Possible health and safety problems in the use of novel plant essential oils and extracts in aromatherapy. *Journal of The Royal Society for the Promotion of Health*, 4, vol 119,240-243 pp.
- 83-LUCCHESI ME, 2005 :** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Science, discipline : Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- 84-LUGASI A., HOVARI J., SAGIK., and BIRO L, 2003:** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica.szegediensis*. 47 (1-4):119-125.
- 85-MAROUF A .2000.** Dictionnaire botanique 129 pp.
- 86- MACHEIX J J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- 87-MAGNAMIP, 1979 :** Culture et cueillette des plantes médicinales. Edition Hachette. Paris, 127p.
- 88- MAJHENIC L., SKERGET M., & KNEZ Z, 2007:** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104,1258-1268.
- 89- MARINO M ., BERSANI C ., COMI, 1999 :** Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Protect.* 62 : 1017-1023pp.
- 90-MARTINI MC, 2006.** « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie ». Éditions Tec & Doc, Paris, pp : 33-55.
- 91-MC FARLAND J, 1907 :** The nephelometer an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *An. Med Assoc:* The nephelometer an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *An. Med Assoc*, 49 1176-1117 pp.
- 92-MEENA J.L et SETHI R, 1994 :** Guides des examens de laboratoire. 4^{ème} édition, 920 P, Méridionales, tome 2 .CNRS .Paris, 860 pp.
- 93-MEYER-WARNOD B, 1984:** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 1984, 9, 93-103.
- 94- MOLYNEUX P, 2004 :** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl-DPPH for estimating antioxidant activity, *Sci. Technol*, 211-219 pp.

- 95-MRLIANOVA M ., TEKEL'OVA D ., FELKLOVA M ., TOTTH J ., MUSIL P et GRANCAI D, 2001** : Comparison of the quality of *Melissa officinalis* L. cultivar Citrawithmellissas of European
- 96-MRLIANOVA M, TEKEL'OVA D, FELKLOVA M, REINÖHL V et TOTTH J, 2002**: The influence of the harvestcutheight on the quality of the herbaldrugsMelissaefolium and Melissa herba.
- 97-MUCHUWETI M. CHIPURURA, B. and MANDITSERAA,F. 2010**.Effects of Thermal Treatment on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Vegetables. Asian Journal of Clinical Nutrition, 2: 93-100pp.
- 98-NAGHIBI F., M. MOSADDEGH, S. MOHAMMADI & A. GHORBANI. 2005**.Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 63-79 pp.
- 99-NATURAL SOURCING, 2009** : MSDS : Materialsafety data sheetlemonbalm essentiel oil. USA.
- 100-NAVES Y.R, 1974** : Technologie deNAVES, Y.R(Technologie des parfums naturels. Edition Masson. Paris ,168p.
- 101-OKMU, DE., 2005**: Phytochemicals, vitamins and minerals contents of two Nigerian medicinal plants Int J MolAdvSci; **1(4)**, 375-381pp.
- 102-ONDREJOVIC M., KRAIC F., BENKOVICOVA H., ŠILHAR S, 2012**:Optimisation of antioxidant extraction from lemon balm(*Melissa officinalis*). Czech J. Food Sci., 30: 385–393pp.
- 103-OWEN PL., JOHNS T, 1999** :Xanthiseoxidaseinhibitory of northe eastern North American plant remedies used for gout.Journal of ethnopharmacology.849p.
- 104-PARIS PP., et HARBIELLE,1981** :Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie.Tome 1. Edition Marson. Paris 183pp.
- 105-PATORA J., MAJDA T ., GORA J et KLIMEK B, 2003** :Variability in the content and composition of essential oilfromlemonbalmcultivated in Poland. J. EndocrinolInvest., 26: 950-955pp.
- 106-PENCHEV P-, 2010** : Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.229pp.
- 107-PHARMACOPEE EUROPEENE, 2002** : 4ème édition, Strasbourg. p 2600

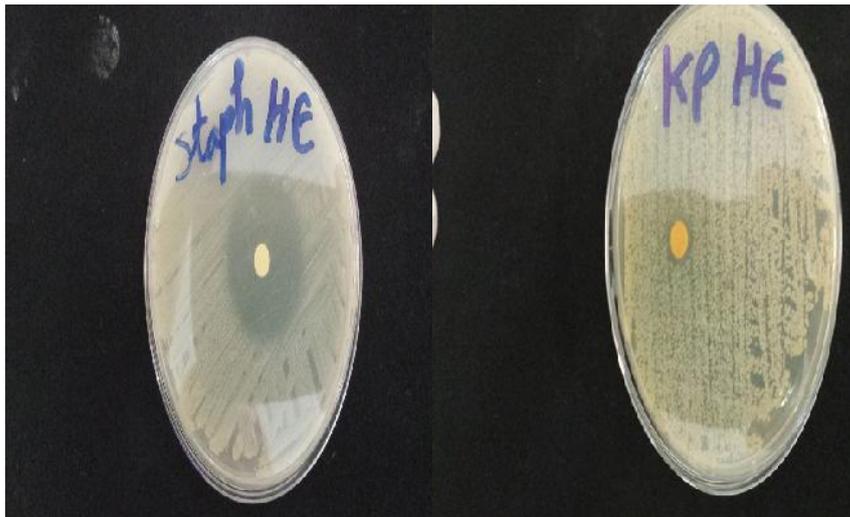
- 108-PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2008** :Conseil de l'Europe 6^{ème} édition, Tome II Strasbourg. 3487pp.
- 109-PHARMACOPEE FRANÇAISE, 1965** :JEAN-PAUL SERGENT, Volume 53, Numéro187. 472-477pp.
- 110-PIBIRI MC, 2006** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles.Thèse de Doctorat, école polytechnique fédérale. EPFL. Lausanne (Suisse), 268pp.
- 111-PIOCHON M, 2008** :Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hemi-synthese. Mémoire de Doctorat. Université du Québec, Canada
- 112-PRESCOTT LM ., HARLEY JP ., KLEIN DA ., DUSART J, 2003** : Microbiologie . De Boeck Université, Bruxelles, 11-25pp.
- 113-QUEZEL P et SANTA S, 1962** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .Tome I. Paris :Centre national de la recherche scientifique .
- 114-RAHTIYARCA BAGDAT R & COSGE B, 2006**: The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis*L.) its components and using fields. Journal of Fac of Agric., OMU, 21(1),116-121pp.
- 115-RAYNAUD, J. 2006** :Prescription et conseil en aromathérapie. Editions Lavoisier.
- 116-ROUX D, CATIER O, 2007** :Botanique, pharmacognosie, phytothérapieCahiers du préparateur en pharmacieCahiers du préparateurPorphyre (Collection)Groupe Liaisons, 2007 - 141 pp.
- 117-ROUX D ., CHAUMONT J-P ., CIEUR C ., MILLET J ., MOREL JM et TALLEC D, 2008** :Conceil en aromathérapie.2^{ème} éd. Editions WoltersKlumer .Paris.187pp.
- 118-SADRAEI H ., GHANNADI A & MALEKSHAHI K, 2003** : Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions, Fitoterapia, 74 (5), 445-452pp.
- 119- SAHREEN S, KHAN MR and KHAN RA, 2010**: Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. Food Chemistry, 122, 1205-1211 pp.
- 120-SALLE JL, 1991**: Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Editions Frison- Roche, Paris.167pp.

- 121-SARI A.O et CEYLON A, 2002:** Yield characteristics and essential oil composition of lemonbalm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turk J. Agric.*
- 122-SARNI-MANCHADO P and CHEYNIER V, 2006 :** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2-10 p.
- 123-SCHNAUBLET K, 1998:** Advanced Aromatherapy. Vermont: Healing Arts Press.
- 124-SEBAI et BOUDALI, 2012 :** LA phytothérapie entre la confiance et la méfiance, mémoire professionnel, infirmier de la santé publique. Algérie.
- 125-SHAHRAM S ., MORTEZA KK et KATAYOON J, 2011:** Aroma Profile of Leaf and Stem of LemonBalm (*Melissa Officinalis*L.) Grown under Greenhouse Conditions. *Advances in Environmental Biology*, 5(4): pp547-550. (ISSN 1995-0756).
- 126-SHAROPOV FS ., WINK M., DAVLAT RK ., ZHANG H ., DOSOKY SN ., and WILLIAM NS, 2013 :** Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Melissa officinalis*L. Growing Wild in Tajikistan, *International Journal of Traditional and Natural Medicines*, 2(2),86-96pp.
- 127-SINGLETON VL., ORTOFER R ., LAMUELA-RAVENTOS RM, 1999 :** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. Orlando. Academic Press. 152-178pp.
- 128-SPICHTER RE., SAVOLAINEN, 2002 :** Figeat, M. et Jeanmonod, D., *Botanique systématique des plantes à fleurs*, 2^{ème} Edition presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 413 pp.
- 129-STANLEY SA, RAGHAVAN S, HWANG WW, COX JS, 2003:** Acute infection and macrophage subversion by require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13001–13006pp.
- 130-STEFLITSCH W., STEFLITSCH M, 2008:** Clinical aromatherapy ». *JMH*, Vol. 5, No. 1, 74-85pp.
- 132-STELLJES M E, 2008 :** Toxicologie for Nontoxicologist. Government institutes, an imprint of the seecarerow Press. Inc., United States of America, 207, 418-425pp.
- 133-SULLIVAN JB ., RUMACK BH ., THOMAS H, 1979 :** Pennyroyal oil poisoning and hepatotoxicity. *Jama*, 28, Vol 246, 203-284pp.
- 134-THORUP I ., WUTZEN G ., CARTENSE T & SLEN P, 1983 :** Short term study in rats dosed with pulegone and menthol. *Toxicology letters*. Vol 19. 207-230pp.
- 135- THURZOVA L, 1981 :** Les plantes- santé qui poussent autour de nous. Ed : Bordas, 268p.

- 136-THURZOVA L ., SABRIER D ., DEVROYE C ., SYMONES M ., FASBENDER B., 1985** :Les plantes- santé qui poussent autour de nous .Bruxelles. Elsevier Squoi, pp 7-236, 286 pp.
- 137-TEUSCHER E ., ANTON R et LOBSTEIN A, 2005** : Plantes aromatiques: épices,aromatesépices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec &Doc. Paris.522p.
- 138-TRUELLE A, 2009**: Le jardin familial de plantes médicinales (mélisse officinale).Gloubik sciences.230pp.
- 139-VALNET J, 1983** : La phytothérapie Traitement des maladies par les plantes 5° édition, Editions Maloine, 280pp.
- 140-VALNET J, 1990** : L'aromathérapie Traitement des maladies par les essences des plantes 10° édition,Editions Maloine267PP.
- 141-VERMERRIS W, NICHOLSON R, 2006**:Phenolic Compound Biochemistry. USA: Springer. Nueva York, EEUU. pp. 3-16, 151-153.
- 142-VOUBOURDOLLE M, 2007** : Toxicologie, science Mathématique, Physique et chimique. Tome 13^{ème} édition Walters Kluwer, 6-7pp.
- 143-WEIPIERRE J, 1981** : Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire, 2ème édition,Masson, Paris, 203pp.
- 144-XIA EQ., DENG GF., GUO YJ and LIH B, 2010**: Biological activities of polyphenols from grapes.International Journal of Molecular Sciences, 11, 622-646pp.

Matériel non biologique

Appareillages	Verreries	Réactifs, solutions et autres
<ul style="list-style-type: none"> • Hydrodistillateur • Balance de précision • Spectrophotomètre • CG/ MS • HPLC • Vortex • Densitomètre • Bec bunsen • Sonde de gavage • Balance pour animaux • Chauffe ballon • Support • Hotte • Bain marie • Etuve d'incubation • Plaque chauffante • Agitateur • Micropipette 	<ul style="list-style-type: none"> • Boîtes de péri stériles à usage unique • Disques de papier wattman • Ecouvillons stériles à usage unique • Entonnoir • Erlenmeyer • FiOLE jaugé • Flacons • Bécher • Portoir pour tubes • Seringues stériles en plastique à usage unique • Pipette pasteur • Pissette • Poire • Ecouvillon • Pince de laboratoire • Burette • Pipettes • Flacon ombré • Fioles jaugées • Tubes à essai stériles • Pipettes graduées • Pince de laboratoire • Papier filtre • Spatule 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthanol • Méthanol pour HPLC • Ethanol • Acide ascorbique • Acide gallique • DPPH • Eau distillé • Folincioaltea • Eau distillée • Eau physiologique • Gélose nutritive • Milieu de culture Mueller Hinton • Disques de papier Wattman de 6 mm • Papier filtre • Etiquette • Papier aluminium • Gants

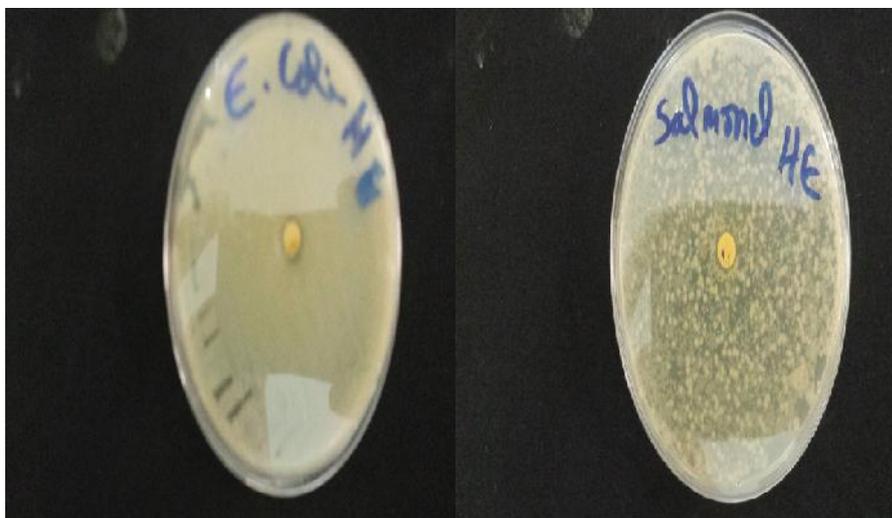


a) *Staphylococcus aureus*.

b) *Klebsiella pneumoniae*.

Figure 1 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle sur les souches bactériennes

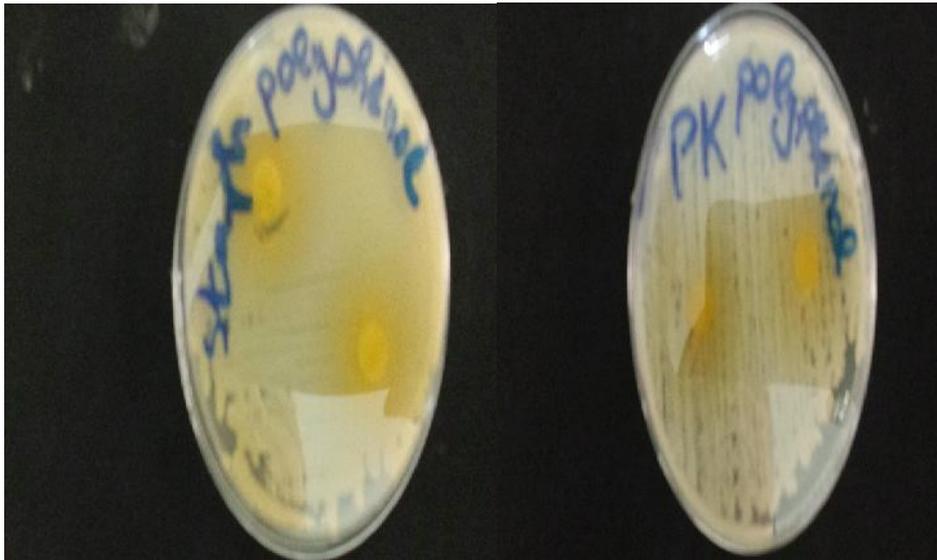
a) *Staphylococcus aureus*. et b) *Klebsiella pneumoniae*.



c) *Escherichia coli*. d) *Salmonella typhi*

Figure 2 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle sur les souches bactériennes

c) *Escherichia coli*. et d) *Salmonella typhi*.



e) *Staphylococcus aureus*.

f) *Kleibseilla pneumoniae*

Figure 3 : Effet de l'extrait des polyphénols totaux sur les souches bactériennes

e) *Staphylococcus aureus*. et f) *Kleibseilla pneumoniae*.



i) *Escherichia coli*. j) *Salmonella typhi*.

Figure 4 : Effet de l'extrait des polyphénols totaux sur les souches bactériennes

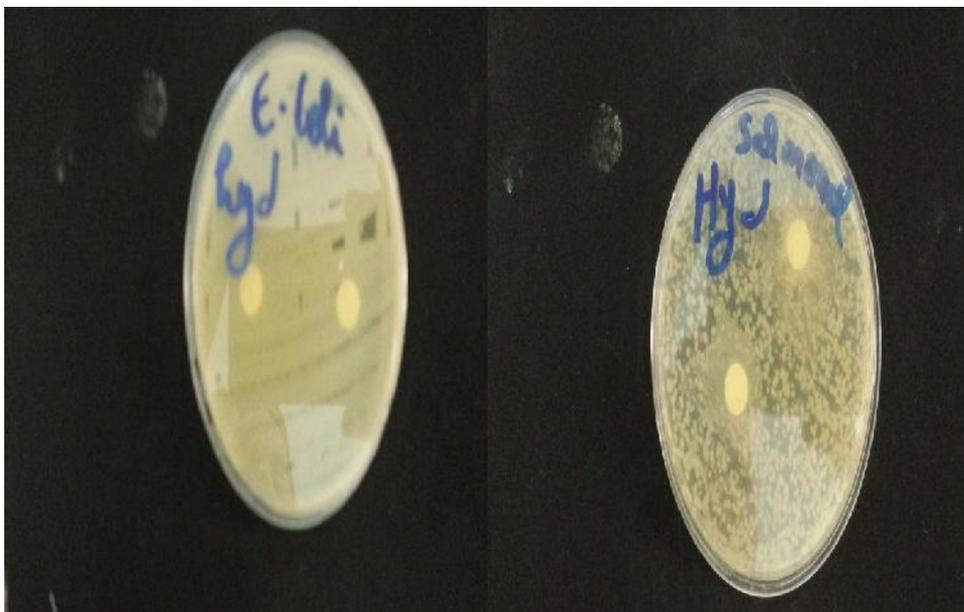
i) *Escherichia coli*. et j) *Salmonella typhi*.



k) *Staphylococcus aureus*. **l)** *Kleibseillapneumoniae*.

Figure 5 : Effet de l'hydrolat sur les souches bactériennes

k) *Staphylococcus aureus*. **l)** *Kleibseillapneumoniae*.



m) *Escherichia coli*. **n)** *Salmonella typhi*.

Figure 6 : Effet de l'hydrolat sur les souches bactériennes

m) *Escherichia coli*. **n)** *Salmonella typhi*.

Appareillages



Figure 1: Spectrophotomètre UV-VIS



Figure 3 : Rota vapeur



Figure 4: H.P.L.C

Tableau X : Analyse chromatographique de l'extrait de polyphénols totaux par HPLC en trois longueur d'onde : = 270 nm, =320nm et =370nm.

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

Peak	RetTime	Type	Width	Area	Height	Area
#	[min]	[min]	[mAU*s]	[mAU]	%	
1	0.884	B	0.0441	85.72231	1.6652	1.8199
2	1.734	BB	0.1807	27.07218	2.04218	0.5747
3	2.572	BV	0.0575	130.38551	33.41539	2.7681
4	2.754	VV	0.0880	232.55135	35.69128	4.9371
5	2.875	VB	0.0992	1160.52612	171.0333724	6381
6	3.947	BB	0.0873	38.54823	5.82081	0.8184
7	4.048	BB	0.0995	49.45707	6.91166	1.0500
8	9.310	BB	0.3780	511.27307	18.87341	10.8544
9	10.406	BV	0.3057	1318.53516	60.63103	27.9926
10	10.881	VB	0.1823	749.31702	62.30784	15.9081
11	11.330	BV	0.1753	70.14999	5.79115	1.4893
12	11.655	VB	0.1485	169.60173	17.28863	3.6007
13	18.072	BB	0.0984	12.19040	1.91228	0.2588
14	19.168	BB	0.1128	17.34886	2.22795	0.3683
15	23.105	BB	0.1242	11.32507	1.34546	0.2404
16	25.091	BB	0.1451	57.14915	5.69408	1.2133
17	28.855	BV	0.1078	11.79057	1.64142	0.2503
18	29.024	VB	0.1288	11.56668	1.31247	0.2456
19	34.319	BBA	0.3196	45.78371	2.13998	0.9720

Totals : 4710.29432 467.24692

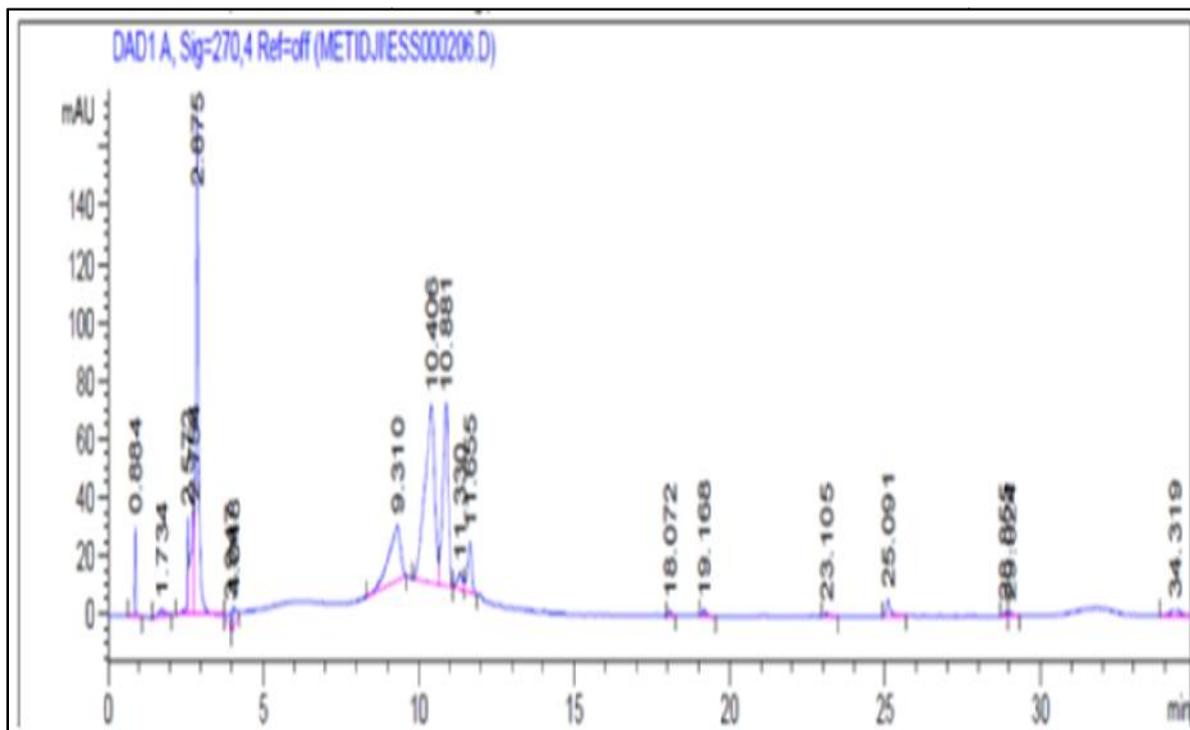


Figure : Profil chromatographique des polyphénols totaux présent dans la plante détectés par HPLC à 270 nm en mode d'élution.

Signal 2: DAD1 B, Sig=320,4 Ref=off

PeakRetTime Type Width Area Height Area

[min] [min] [mAU*s] [mAU] %

#	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.884	BB	0.0429	59.97162	22.64997	1.6172
2	1.734	BB	0.2066	28.47173	1.83880	0.7678
3	2.541	BB	0.0622	7.86667	1.82821	0.2121
4	2.669	BV	0.0862	40.85376	7.65959	1.1017
5	2.880	VB	0.1019	951.53522	132.28770	25.6599
6	4.061	BB	0.1047	32.37990	4.92740	0.8732
7	9.290	BV	0.4645	375.24213	10.93109	10.1191
8	10.291	VV	0.4138	1566.74756	55.08161	42.2502
9	10.882	VV	0.1940	282.56656	21.13651	7.6199
10	11.159	VV	0.1858	183.74162	14.31001	4.9549
11	11.627	VB	0.1777	107.96894	9.28397	2.9116
12	11.996	BB	0.2119	33.99593	2.47990	0.9168
13	18.075	BB	0.0973	10.13543	1.57043	0.2733
14	18.807	BB	0.1003	7.90844	1.20980	0.2133
15	19.168	BB	0.1061	18.87703	2.74987	0.5091

Totals : 3708.26253 289.94487

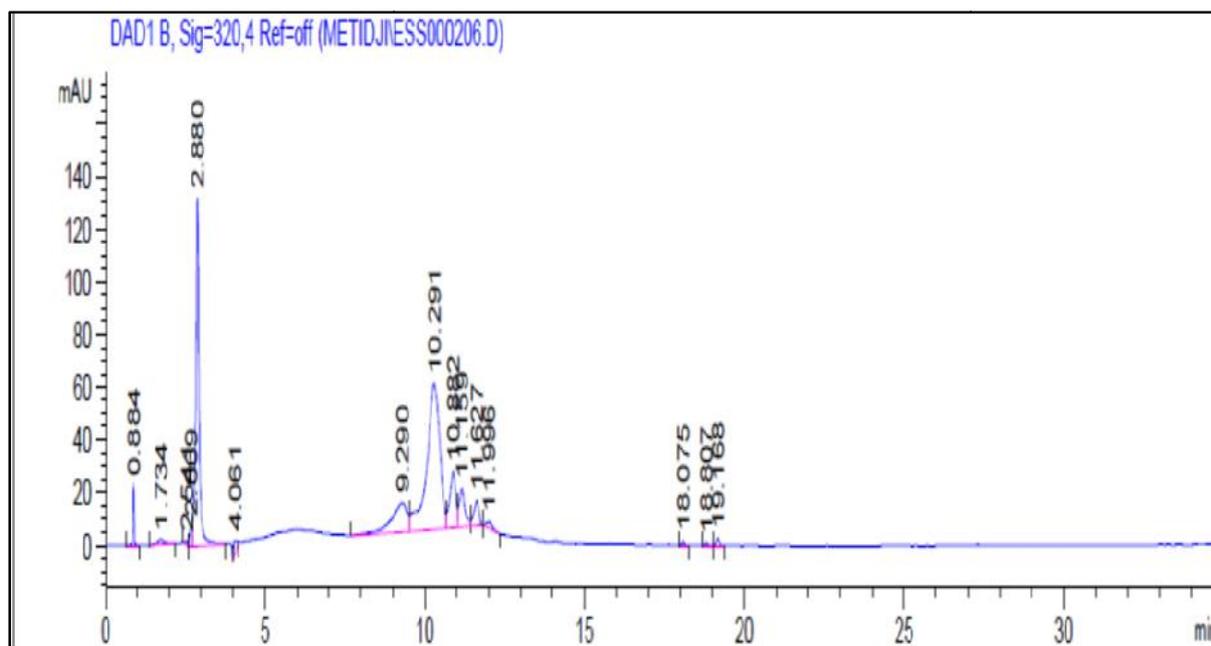


Figure 17 : Profil chromatographique des polyphénols totaux présent dans la plante détectés par HPLC à 320 nm en mode d'éluion.

Signal 3: DAD1 C, Sig=370,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.885	BB	0.0417	44.59515	17.54026	4.7505
2	1.735	BB	0.2347	38.71317	2.16439	4.1239
3	2.531	BB	0.0809	20.78552	4.26495	2.2142
4	2.673	BV	0.0900	39.75644	7.24260	4.2350
5	2.882	VB	0.1197	548.12775	62.86000	58.3892
6	9.242	BV	0.3715	133.44936	4.93462	14.2157
7	9.628	VB	0.2210	34.18750	2.33299	3.6418
8	10.240	BB	0.2002	29.04613	2.06377	3.0941
9	10.877	BB	0.1564	17.87558	1.79165	1.9042
10	34.317	BBA	0.3124	32.21121	1.51264	3.4313

Totals : 938.74779 106.70787

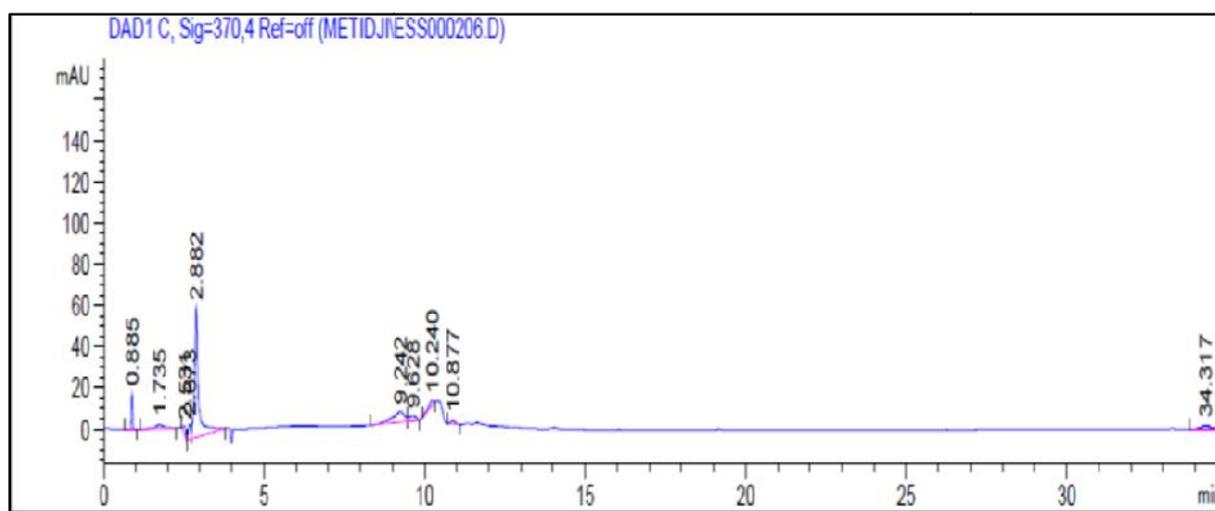


Figure 18 : Profil chromatographique des polyphénols totaux présent dans la plante détectés par HPLC à 370 nm en mode d'élution.

Tableau : Résultats des étalons (standards).

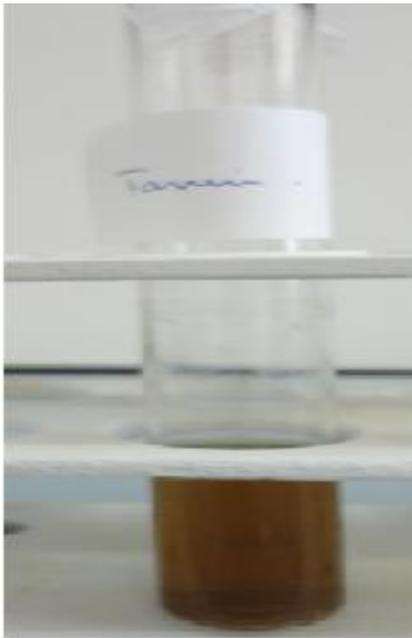
Etalon	Temps de rétention		
	=270 nm	=320 nm	=370 nm
Ac salicylique	13.629	13.629	Abs
Accoumarique	14.505	14.490	14.502
Ac gallique	2.507	2.505	Absence
Ac ascorbique	2.305	Abs	Absence
Catéchine	7.262	7.313	7.273
Quercitine	13.041	13.040	13.041
Rutine	9.436	9.417	9.414
vanilline	10.327	10.331	10.330
Accholorogénique	8.137	8.137	8.137
Ac caféique	2.827	2.821	2.821
Ac tannique	2.338	2.34	absence

Tableau : pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique et de l'extrait des feuilles de *Melissa officinalis* L.

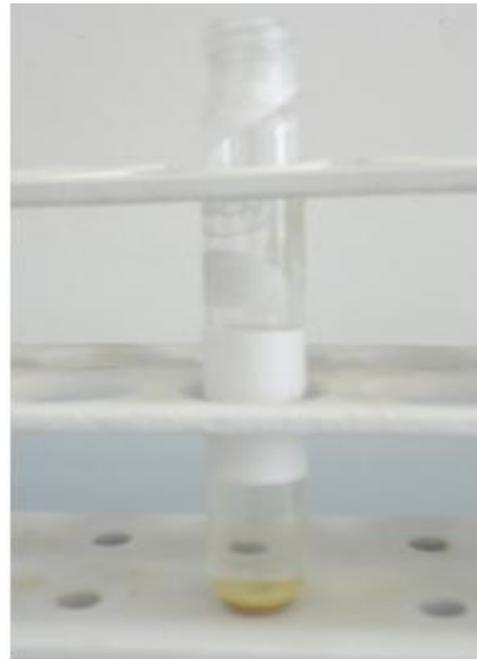
Dilution	Acide ascorbique		polyphénols	
	DO	% d'inhibition	DO	% d'inhibition
0.5	0.122	93.82	0.074	96.25
0.05	0.972	88.55	0.538	72.78
0.005	1.002	50.83	0.850	51.84
0.0005	1.044	48.81	0.917	53.61
0.00005	1.017	47.19	1.012	48.81

Tableau :

concentration µg/ml	0.002	0.002	0.2	2	20
absorbance à765 nm	0.0964	0.301	0.501	0.75	1



Identification des tanins



Identification des saponosides



Identification des flavonoïdes

La région de Hammam Melouane

La zone d'étude est localisée dans la vallée d'Oued El-Harrach (juste avant son débouché dans la plaine de Mitidja). La zone est située dans la commune de Hammam Melouane (Daïra de Bougara, Wilaya de Blida) à environ 40 Km au sud-ouest d'Alger.

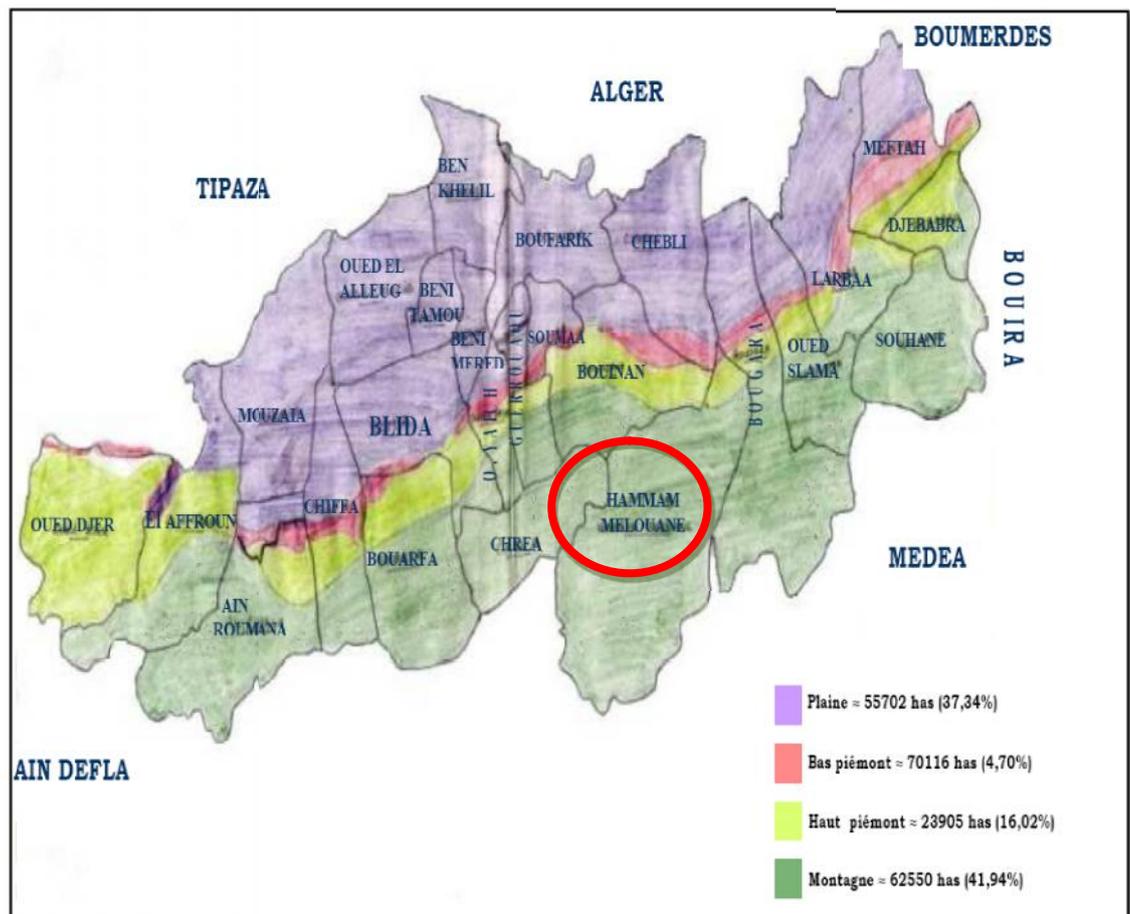


Figure 5 : Localisation de la zone d'étude : Hammam Melouane (PARC NATIONAL CHREA, 2010).

❖ Caractéristiques pédoclimatiques de la région

Les données pédoclimatiques de la zone d'étude ont été recueillies auprès de l'Institut National des Ressources Hydrauliques (INRH) de Soumâa et du Parc National de Chréa (PNC), secteur Hammam Melouane.

Le territoire de Hammam Melouane présente un relief accidenté et montagneux, il est couvert à près de 85% par des broussailles, maquis avec une dominance d'arbres forestiers.

Le climat de Hammam Melouane est méditerranéen, il est sec et chaud en été, frais et pluvieux en hiver. Selon, les données de la station météorologique, la moyenne annuelle des températures est instable, car elle varie de 15 °C en période hivernale à 33°C en période estivale, cette température pourrait baisser jusqu'à 5°C en hiver et augmenter à 35°C en été. La pluviométrie ne dépasse pas les 700 mm/an. Pour l'année 2008, la pluviométrie enregistrée est de 572 mm, dans cette région, ce sont les vents de l'est-ouest qui prédominent ; tandis que le sirocco, il se manifeste un à trois jours par an