

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**  
**Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et Biologiques**  
Département de Biologie

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Biotechnologies végétales

EXTRACTION, CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE  
QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES ACTIFS D'UNE  
PLANTE A CARACTERE THERAPEUTIQUE,  
*Melissa officinalis* L.

Par

**Souad FEKNOUS**

Devant le jury composé de

M.S. HAMAIDI	M C A	U.S.D de Blida	Président
S.A. SNOUSSI	Professeur	U.S.D de Blida	Examineur
S. MEGATLI	M C B	U.S.D de Blida	Examineur
F. SAIDI	Professeur	U.S.D de Blida	Promotrice
R. MOHAMED SAID	M A A	U.S.D de Blida	Co-promoteur

Blida, février 2012

## RESUME

*Melissa officinalis* L. est une plante appartenant à la famille des Lamiacées. En Algérie, cette plante assez commune est largement cultivée. Elle est populairement réputée pour son action calmante des tensions nerveuses.

L'étude phytochimique et les extractions réalisées ont permis de quantifier une teneur de 0.17% d'huile essentielle, 7.6% de tanins et 0.6% d'hétérosides flavoniques.

L'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse nous a permis de connaître la composition qualitative de l'huile essentielle de la plante (citral, oxyde de caryophyllène, bergamotène et citronellyl acétate).

L'étude du pouvoir antioxydant a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les extraits de la mélisse à piéger les radicaux libres après une comparaison avec des antioxydants de synthèse puissants.

L'étude antimicrobienne des extraits de *Melissa officinalis* L. a révélé une importante action inhibitrice sur la croissance des germes pathogènes en milieu gélosé, notamment l'effet de l'huile essentielle et l'hydrolat sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

**Mots clés** : plantes médicinales ; *Melissa officinalis* L. ; huile essentielle ; métabolites secondaires ; effet antioxydant ; effet antibactérien.

## ABSTRACT

*Melissa officinalis* L. is a plant belonging to the family of Lamiaceae. In Algeria, this plant fairly common is widely grown. It is popularly famous for its action calming nervous tension.

The chemical screening of the plant enabled us to quantify 0.17% of essential oil, 7.6% of tannins and 0.6 % of flavonic heterosids.

The use of fine techniques such as the gas chromatography coupled with the spectrophotometer of mass enabled us to also know the qualitative composition of the essential oil of this plant (citral, caryophyllene oxide, bergamotene and citronellyl acetate).

The antioxidant study confirmed the properties that have the powerful balm extracts to scavenge free radicals after a comparison with synthetic antioxidants powerful.

The antimicrobial study of extracts of *Melissa officinalis* L., showed a significant inhibitory effect on the growth of pathogens germs in agar media, including the effect of the essential oil and hydrosol on the growth of *Staphylococcus aureus*.

**Key words** : medicinal plants ; *Melissa officinalis* L. ; essential oil ; secondary metabolites ; antioxidant effect ; antimicrobial effect.

## ملخص

*Melissa officinalis* L. تنتمي إلى عائلة Lamiacées. في الجزائر هذه النبتة شائعة إلى حد كبير و تزرع على نطاق واسع. تشتهر شعبيا بفضل فعلها المهدئ للتوتر العصبي.

مكنت لنا الدراسة الكيميائية للنبتة تحديد نسب المكونات المستخلصة التي هي 0.17 % من الزيوت الأساسية، 7.6 % بالنسبة لمادة الدباغ (tanins) و 0.6 % بالنسبة للسكريات الفلافينية غير المتجانسة (hétérosides flavoniques).

بفضل استخدام تقنية الكروماتوغرافية الغازية المقرونة بطيف الكتلة (CGMS)، استطعنا أن نتعرف على التركيب النوعي للزيت الأساسية للنبتة (citral ، oxyde de caryophyllene ، bergamotene و citronellyl acétate).

أكدت دراسة الفعالية المضادة للاكسدة أن لمستخلصات النبتة خصائص قوية في كبس الجذور الحرة و ذلك بالمقارنة مع مواد اصطناعية ذات فعالية قوية ضد الأكسدة.

كما أظهرت دراسة الفعالية ضد الميكروبات لمستخلصات النبتة (*Melissa officinalis* L.) تأثير كبير مثبت على نمو الجراثيم في وسط آجار، بما في ذلك أثر كل من الزيت الأساسية والحلابة المائية على نمو المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*).

**الكلمات المفتاح:** النباتات الطبية، *Melissa officinalis* L.، الزيوت الأساسية، المركبات الثانوية، الأثر المضاد للأكسدة، الأثر المضاد للجراثيم.

## DEDICACES



*Avec une énorme joie je dédie ce modeste travail aux plus chères personnes de ma vie :*

*A mes très chers parents pour leur sacrifice et encouragements.*

*A mes sœurs Fadila et Zakia et mes frères Sofiane et Ahmed.*

*A mon beau frère Mourad pour tout l'appui qu'il m'a apporté.*

*A ma tante Samya à qui je dois beaucoup.*

*A ma belle sœur Imen et ma cousine Mebarka.*

*Aux anges de la famille Ahlem, Abderrahmen, mokhtar et Oussama.*

*A mes meilleurs amies Cherine, Asma et Lamia.*

*A ma sœur Khadidja qui a su honorer le mot amitié, a son frère Abdennour et ses sœurs pour leur aide et soutien.*

*A mes chères amies : Tassadit, Zahira, Wafia, Miyada, Nawel, Aicha et Yasmina pour leurs soutien moral ainsi qu'à Amina et Chahinez et tout mes collègues de la DRC.*

*A ceux qui ont fait preuve d'une amitié sincère : Brahim, Sid Ahmed et Djamel pour leur fraternité et fidélité exemplaire.*

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

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

**SOUAD**



## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier Dieu tout puissant pour m'avoir montré la voie, guidé et donné le courage, la force et la volonté afin de mener à bien ce travail.*

*Je ne saurais trouver les termes qu'il faut pour exprimer ma profonde gratitude et la reconnaissance que je dois à ma promotrice Mme SAIDI .F. auprès de qui j'ai toujours trouvé une oreille attentive, des conseils bienveillants ainsi que l'aide, l'appui et la compréhension.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Mr MOHAMED SAID .R. qui a eu la gentillesse de codiriger ce travail et pour ses orientations précieuses.*

*Je remercie très respectueusement Mr HAMAIDI .M.S. qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Mes remerciements vont à Mr SNOUSSI .S.A. et Mr MEGATLI .S. qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Particulièrement je remercie deux personnes sans qui je ne serais jamais arrivée au bout de mes peines, Mr AIT-ABDERRAHMANE .A. Directeur Général au Ministère du Commerce et Mr SAID-MANSOUR .Y. Chef de service à la DRC de Blida qui m'ont permis de poursuivre mes études tout en exerçant ma profession, pour cela je leur en serais toujours gré.*

*Ma sympathie et ma reconnaissance sont aussi exprimées à Mr HAINE .M. pour sa bonne humeur permanente et son extrême gentillesse ainsi qu'à Mr EL HOUARI, Mr BOUTOUMI, Mr BADIS, Mr BELKACEM et Mme ZAHIRA pour leur aide précieuse.*

*Je remercie l'ensemble du personnel du Parc National de Chréa   Blida ainsi que ceux de la direction de Hammam Melouane, en particulier Mr Chafik, Djamila, Yacine et Farouk.*

*Mes remerciements vont aussi   l'ensemble du personnel du laboratoire technique de la police scientifique d'Alger, en particulier Mme SADAT, Mme DENNI et Mme ABES.*

*Je n'oublierai pas de remercier mes camarades de promotion Nafissa, Fettouma, Dalila, Asma, Fatiha et Lila pour l'aide, l'amitié et les moments forts que nous avons vécu ensemble.*

*Enfin je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble du personnel des départements de Biologie, d'Agronomie et de Chimie Industrielle ainsi que tous les enseignants qui ont contribué   ma formation.*



## TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	13
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1.1. Généralités sur les plantes médicinales	15
1.1.1. Généralités	15
1.1.2. Définitions	16
1.1.3. Traitement des plantes médicinales	16
1.1.4. Les préparations phytothérapeutiques	18
1.1.5. Les principes actifs des plantes médicinales	20
1.2. Étude botanique de la mélisse	22
1.2.1. Historique	22
1.2.2. Systématique et synonymes botaniques	23
1.2.3. Dénominations vernaculaires	24
1.2.4. Répartition géographique	25
1.2.5. Description de la plante	25
1.2.6. Culture	29
1.2.7. Récolte	30
1.2.8. Conservation	30
1.3. Les principes actifs de la mélisse	30
1.3.1. Composition chimique de la mélisse	30
1.3.2. Principales familles de métabolites secondaires chez <i>Melissa</i>	32

1.4. La mélisse et la thérapie	41
1.4.1. Les vertus thérapeutiques de la mélisse	41
1.4.2. Doses et modes d'administration	42
1.4.3. Effets indésirables et contre-indication	42
2. MATERIEL ET METHODES	44
2.1. Matériels	44
2.2. Méthodes	45
2.2.1. Identification botanique de la plante	46
2.2.2. Etude phytochimique de <i>Melissa officinalis</i> L.	46
2.2.2.1. Détermination de la teneur en eau	46
2.2.2.2. Détermination de la teneur en cendres	47
2.2.2.3. Etude des principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.	48
2.2.2.3.1. Étude des composés volatils.	48
2.2.2.3.2. Étude des composés non volatils polaires et apolaires	52
2.2.2.3.3. Extraction de certains principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.	57
2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Melissa officinalis</i>	63
2.2.4. Etude de l'activité antimicrobienne de <i>Melissa officinalis</i> L.	65
3. RESULTATS ET DISCUSSION	69
3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante	69
3.1.1. Etude macroscopique	69
3.1.2. Etude microscopique	74
3.2. Résultat de l'étude phytochimique de <i>Melissa officinalis</i> L.	79
3.2.1. Détermination de la teneur en eau	79
3.2.2. Détermination de la teneur en cendres	80
3.2.3. Etude des principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.	81
3.2.3.1. Etude des composés volatils.	81
3.2.3.2. Étude des composés non volatils apolaires et polaires	86
3.2.3.3. Extraction de certains principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.	90
3.3. Résultat du test du pouvoir antioxydant de <i>Melissa officinalis</i> L.	91
3.3.1. Résultats de l'absorbance du DPPH	91

3.3.2 .Evolution de l'inhibition radicalaire	93
3.3.3 .Estimation du pouvoir antioxydant des extraits de mélisse	95
3.4. Résultat de l'activité antimicrobienne de <i>Melissa officinalis</i> .	97
3.4.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongique	97
3.4.2 .Test par diffusion sur gélose du pouvoir antimicrobien des extraits	99
CONCLUSION	105
APPENDICES	
REFERENCES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Les jeunes pousses de la mélisse	26
Figure 1.2: Vue de <i>Melissa officinalis</i> L.	26
Figure 1.3: Coupe transversale de la tige quadrangulaire.	26
Figure 1.4: <i>Melissa officinalis</i> : face inférieure et supérieure de la feuille.	27
Figure 1.5: Le regroupement des fleurs de <i>Melissa officinalis</i> L.	28
Figure 1.6: Tétrakène en coupe avec une graine par loge.	29
Figure 1.7: Structure chimique des principaux constituants de l'HE de mélisse	32
Figure 1.8: Coupe d'une feuille montrant la glande sessile	33
Figure 1.9 : Schémas récapitulatif des principales méthodes d'extraction des HE34	
Figure 2.1: Séchage de <i>Melissa officinalis</i> L.	45
Figure 2.2: Montage de l'entraînement à la vapeur.	49
Figure 2.3: Système d'extraction au soxhlet.	53
Figure 2.4 : Protocole expérimental de l'extraction par Soxhlet.	54
Figure 2.5. Schéma du développement chromatographique d'une plaque.	56
Figure 2.6 : Protocole expérimental de l'extraction des tanins.	59
Figure 2.7 : Protocole expérimental de l'extraction des flavonoïdes.	62
Figure 2.8 : Forme libre et réduite du DPPH.	63
Figure 2.9 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes.	67
Figure 3.1: Vue d'une partie de la tige à la loupe Gx 2.5.	69
Figure 3.2: Vue d'une feuille (face supérieur et inférieur) à la loupe binoculaire.	70
Figure 3.3: Vue de la fleur à la loupe binoculaire.	71
Figure 3.4: Vue de l'ovaire à la loupe binoculaire.	72
Figure 3.5: Vue de la fleur (étamines) à la loupe binoculaire.	73
Figure 3.6: Vue des graines à la loupe binoculaire Gx 4.5.	74
Figure 3.7: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 10.	75
Figure 3.8: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40.	75
Figure 3.9: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40.	76

Figure 3.10: Observation microscopique des poils au niveau de la tige Gx 40.	76
Figure 3.11: Coupe transversale au niveau de la feuille Gx 10.	77
Figure 3.12: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40.	77
Figure 3.13: Coupe transversale au niveau du pétiole Gx 10.	78
Figure 3.14: Coupe transversale au niveau du pétiole Gx 40.	78
Figure 3.15: Observation microscopique des poils au niveau du pétiole Gx 40.	79
Figure 3.16: Teneur en eau de <i>Melissa officinalis</i> L.	80
Figure 3.17: Teneur en cendres de <i>Melissa officinalis</i> L.	81
Figure 3.18: Chromatogramme de la fraction volatile de <i>Melissa officinalis</i> L.	83
Figure 3.19: Spectre de masse du néral (Citral b).	84
Figure 3.20: Spectre de masse de l'oxyde de caryophyllene.	84
Figure 3.21: Spectre de masse de bergamotene.	85
Figure 3.22: Spectre de masse de l'acétate de citronellyl	85
Figure 3.23: Teneur en composés apolaires et polaires de <i>Melissa officinalis</i> L.	87
Figure 3.24: Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de <i>Melissa officinalis</i> L.	88
Figure 3.25: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de <i>Melissa officinalis</i> L.	88
Figure 3.26: Evolution de l'absorbance des solutions de témoins testés	92
Figure 3.27: Evolution de l'absorbance des solutions des échantillons testés	93
Figure 3.28: Evolution du % de l'inhibition radicalaire des témoins testés	94
Figure 3.29: Evolution du % de l'inhibition radicalaire des échantillons testés	95
Figure 3.30: Classement croissant des substances testées selon leur EC50.	96
Figure 3.31: Résultats de l'incubation des souches testées par antibiogramme.	98
Figure 3.32: Résultats de l'antifongigramme.	98
Figure 3.33: Résultats de l'incubation des souches testées par HE	100
Figure 3.34: Zone d'inhibition de <i>S. aureus</i> par l'HE.	100
Figure 3.35: Zone d'inhibition de <i>E. faecalis</i> par l'HE.	100
Figure 3.36: Zone d'inhibition de <i>E. coli</i> par l'HE.	100
Figure 3.37: Zone d'inhibition de <i>S. aureus</i> par l'HA.	101
Figure 3.38: Zone d'inhibition de <i>B. subtilis</i> par l'HA.	101
Figure 3.39: Résultats de l'incubation des souches testées par HA	102
Figure 3.40: Résultats de l'incubation des souches testées par l'extrait polaire	103
Figure 3.41: Zone d'inhibition de <i>C. albicans</i> par l'extrait polaire.	103
Figure 3.42: Résultats de l'incubation des souches testées par l'infusé	104

Tableau 1.1: Position systématique de <i>Melissa officinalis</i> .	23
Tableau 1.2: Classification phylogénétique de <i>Melissa officinalis</i> .	24
Tableau 2.1: Les révélateurs et les métabolites recherchés dans la concrète	57
Tableau 2.2: Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.	66
Tableau 2.3: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés.	68
Tableau 3.1: Résultats de la teneur en eau	80
Tableau 3.2: Résultats de la teneur en cendres	80
Tableau 3.3: Résultats du rendement	81
Tableau 3.4: Caractéristiques organoleptiques de l'HE	82
Tableau 3.5: Composition chimique de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.	86
Tableau 3.6: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires.	87
Tableau 3.7: Résultats de la teneur en tanins	90
Tableau 3.8: Résultats de la teneur en flavonoïdes	90
Tableau 3.9: Résultats de l'antibiogramme (Diamètre de la ZI en mm)	97
Tableau 3.10: Résultats de l'aromatogramme	99
Tableau 3.11: Effet de l'hydrolat de <i>Melissa</i> sur les souches microbiennes.	101
Tableau 3.12: Effet de l'extrait polaire sur les souches microbiennes.	102
Tableau 3.13: Effet des infusions de <i>Melissa</i> sur les souches microbiennes.	104

## INTRODUCTION

Autrefois les plantes médicinales étaient l'une des seules sources de guérison des maladies. Ce sont de vrais remèdes, des pharmacies naturelles que la providence a établi sur cette terre pour prévenir nos maux ou pour les guérir [1].

A l'instar d'autres contrées du monde, l'Algérie possède aussi ses "jardins splendides" avec ses plantes vertueuses et la médecine traditionnelle, ainsi pratiquée, trouve un accueil favorable auprès des populations qui sont, hélas, parfois en proie à un charlatanisme ignorant et dangereux pour les malades [2].

Il est important de s'assurer de l'innocuité d'une plante, de connaître ses possibilités et ses limites et de savoir dans quelles conditions on peut l'utiliser.

Actuellement les travaux de recherches scientifiques confirment le bien fondé de ces notions populaires découlant d'un pur empirisme. Ainsi le remède de « grand-mère » devient un traitement sérieux, étayé par des résultats expérimentaux [3].

La phytothérapie moderne s'efforce principalement de prouver scientifiquement l'efficacité des remèdes à base de plantes et d'en contrôler les risques. Ces paramètres se mesurent selon des normes internationales et dans le respect des directives européennes [4].

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à une plante parmi toutes les espèces de plantes poussant sur le sol algérien, très utilisée en phytothérapie, il s'agit de *Melissa officinalis* L.

La méthode de travail, que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant la valorisation de la matière végétale. Cette méthode

permet de relier les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes au travail des chimistes et des biologistes.

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour une plante d'utilisation fréquente et très connue par les herboristes algériens.

En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de notre recherche, notamment les constituants naturels tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles.

Pour cela, notre étude vise les objectifs suivants:

- ❖ Identification botanique de la plante récoltée;
- ❖ Etude phytochimique de la plante par l'extraction, dosage et l'analyse de ses composés chimiques actifs par diverses techniques.
- ❖ Evaluation du pouvoir antioxydant de *Melissa officinalis* L.
- ❖ Etude biologique portant sur l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne de cette plante *in vitro* vis-à-vis des souches microbiennes de référence.

## **CHAPITRE 1**

### **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### 1.1. Généralités sur les plantes médicinales

##### 1.1.1. Généralités

Depuis la nuit des temps, l'homme constatant la fragilité de sa santé, s'est soigné par ce que la nature mettait à sa disposition. C'est-à-dire les plantes, nommées « la pharmacie de Dieu » [5].

La sélection des plantes médicinales s'est faite durant des dizaines de milliers d'années par nos ancêtres qui, observant leurs effets positifs ou négatifs, bien avant la naissance de la médecine scientifique [6].

Peu à peu, à partir du 19<sup>e</sup> siècle, la phytothérapie acquiert une dimension plus rigoureuse. Cette dernière comprend l'examen botanique des végétaux, l'étude de leur composition chimique et de leur efficacité sur l'organisme [7].

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 28 % de toutes les espèces végétales existantes sont utilisées à des fins médicales. L'OMS a répertorié plus de 22000 plantes utilisées par la médecine traditionnelle, dont environ 1200 sont inscrites dans la pharmacopée française [4];[8].

Bien des médicaments actuels sont tirés de plantes utilisées depuis des siècles. L'aspirine, extraite à l'origine des fleurs de reine-des-prés, en est l'exemple le plus célèbre [6].

L'histoire de la phytothérapie passe donc par un paradoxe, puisque l'exploitation par la chimie des propriétés de chaque plante aboutit à la création de molécules de synthèse, dont les effets sont plus faciles à maîtriser [7].

### 1.1.2. Définitions

#### 1.1.2.1. Les plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante qui renferme un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation [9].

#### 1.1.2.2. La phytothérapie

La phytothérapie est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plante [10].

#### 1.1.2.3. L'aromathérapie

L'aromathérapie est l'art et la science d'utiliser des huiles essentielles (HE) pour maintenir ou améliorer la santé et la beauté. Etymologiquement, ce mot signifie le traitement des maladies (thérapie) par les arômes (essences ou HE provenant de plantes aromatiques). Toutes les anciennes civilisations ont utilisé l'aromathérapie pour leur bien-être physique et psychologique [11].

L'action conjuguée de l'aromathérapie et de la phytothérapie est naturellement des plus évidentes et très complémentaire [12].

### 1.1.3. Traitement des plantes médicinales

L'action médicinale des préparations galéniques dépend de la croissance de la plante, du moment de la récolte et de la manière dont les produits récoltés sont séchés et conservés [13].

#### 1.1.3.1. Récolte des plantes médicinales

Une multitude de facteurs (climat, terrain, altitude) seront responsables des propriétés médicinales de ces plantes [5].

La teneur en principes actifs d'une plante médicinale varie avec l'organe considéré, mais aussi avec l'âge de la plante, l'époque de l'année et même l'heure de la journée [14].

Pour une utilisation optimale de leurs propriétés médicamenteuses, la récolte de la plante s'effectue au moment où les substances actives se trouvent au maximum de leur concentration [15].

La cueillette se fait par temps sec, après le levé du soleil lors de la disparition de la rosée. Les parties aériennes de la plante se récoltent surtout à l'époque de la floraison [13].

#### 1.1.3.2. Séchage des plantes médicinales

La dessiccation est une étape extrêmement délicate, dont dépend la qualité du produit conservé. Cette opération, qui permet d'éliminer l'humidité des végétaux, s'exécute juste après la récolte [15].

Il est important d'étendre les plantes en couches minces, les différentes parties ne se recouvrant pas. Faute de cette précaution, le séchage est fortement ralenti et il peut intervenir des fermentations avec perte de principes actifs [16].

Le maximum de température admise pour une bonne dessiccation à l'air libre des plantes aromatiques ou les plantes contenant des huiles essentielles est de 30°C [2].

Dans de bonnes conditions (obscurité, aération, endroit sec), une plante met au plus six jours à sécher. Elle doit alors être cassante, exempte de moisissure ou de larves d'insectes. Une couleur d'origine conservée témoigne d'un excellent séchage [17].

### 1.1.3.3. Conservation des plantes médicinales

Pour bien conserver les plantes, il faut éviter l'humidité et la lumière : celles-ci en effet accélèrent l'oxydation qui altère les parties de plantes séchées [7].

Une fois les plantes séchées, il faut les mettre dans des sacs en papier kraft, en prenant soin d'y inscrire la date de récolte, le lieu et le nom de la plante. Les bocaux (en verre ou en métal, mais pas en plastique) permettent de bien conserver les plantes remises dans une pièce sèche, à l'écart de toute source de chaleur [7].

Une plante médicinale conserve en général une année durant toutes ses propriétés, ensuite, celles-ci se dégradent [17].

### 1.1.4. Les préparations phytothérapeutiques

Le succès d'un traitement aux plantes médicinales dépend de leur préparation [16].

Il existe en effet de nombreuses façons de les utiliser : fraîches ou séchées, par un usage interne ou externe, traitées ou non. On peut utiliser une plante seule ou un mélange de plusieurs de celles-ci, parfois même des plantes combinées avec d'autres préparations naturelles [13].

La manière la plus courante d'utiliser les plantes séchées est d'en faire des tisanes [9].

Ce sont des préparations aqueuses obtenues à partir d'échantillons végétaux convenablement divisés et dont la quantité à utiliser varie selon la plante. Elles peuvent être préparées en : infusion, décoction ou macération [18].

\* Infusion : Consiste à verser l'eau tiède ou bouillante sur les organes de plantes (fleurs, feuilles, baies, racines) et à laisser reposer en couvrant hermétiquement, de 1 à 30 minutes. Après cette opération, on filtre le produit obtenu [5].

\* Décoction : Consiste à placer la plante dans l'eau froide, la porter à ébullition durant 10 à 15 minutes, puis laisser tirer un quart d'heure [16].

\* Macération : Cette technique permet d'extraire lentement tous les principes actifs, surtout ceux que des températures élevées risqueraient d'altérer [15];[19]. Elle consiste à mettre une certaine quantité d'herbe sèche ou fraîche dans un liquide (eau, vin, alcool à froid) [2].

Les présentations et préparations phytothérapeutiques ont évolué de façons très diverses, dont on peut définir :

- ✓ La poudre : les plantes séchées à l'ombre sont finement coupées puis broyées dans un mortier. Ces plantes seules ou en mélange sont vendues en sachets (infusettes) pour en faire des tisanes. Certains malades prennent la poudre directement sur la langue, ou la mélange à leurs aliments [9].
- ✓ Les huiles essentielles et essences aromatiques : substances odorantes extraites de certains végétaux par des procédés divers : distillation à la vapeur, incision, expression simple [20].
- ✓ Les teintures : Ce sont des préparations qui résultent de l'action de l'alcool éthylique sur les poudres végétales [21].
- ✓ L'alcoolature : Elle est obtenue par la macération de la plante fraîche dans l'alcool [5].
- ✓ Les alcoolats : Ils sont obtenus par distillation des principes actifs de substances végétales au contact de l'alcool [21].
- ✓ Les extraits : Ce sont des macérations aqueuses ou alcooliques que l'on concentre plus ou moins par évaporation. On obtient de cette manière des extraits fluides, épais ou solides [9].
- ✓ Les hydrolats : Ils sont appelés plus communément « Eaux Distillées ». C'est un entraînement par distillation des principes volatils de poudre végétale ou de parties de plantes [21].
- ✓ Les sirops : C'est une infusion à laquelle on rajoute du sucre ou du miel à part égale pour obtenir la consistance d'un sirop à la cuisson [17].
- ✓ Le jus (Suc frais) : Il s'obtient en pressant les fruits frais ou bien en broyant les plantes avant de les presser vigoureusement [19].

### 1.1.5 Les principes actifs des plantes médicinales

Les feuilles alimentées en éléments simples (eau, sels minéraux, oligo-éléments) et, recevant l'énergie du soleil, synthétisent un ensemble de molécules organiques très complexes qui sont des agents des vertus médicinales du monde végétal [6].

Ces molécules sont très nombreuses. Elles sont classées en quelques grandes familles:

- ❖ Les acides organiques: Ils règlent la diffusion de l'eau à travers les parois de la cellule et donnent le goût acidulé propre à de nombreuses plantes, comme l'acide malique de la pomme, l'acide citrique des agrumes ou l'acide oxalique de l'oseille. Ils peuvent agir comme laxatifs légers, mais absorbés en grande quantité certains sont toxiques [16];[6];[13].
- ❖ Les alcaloïdes: Ce sont des substances azotées, plus ou moins basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils sont issus, au moins pour partie, du métabolisme des acides aminés et possèdent des propriétés pharmacologiques marquées [22];[2].
- ❖ Les glucosides: Ils sont contenus en grande quantité dans le suc cellulaire de certaines plantes. Ils jouent un grand rôle dans le stockage des réserves nutritives et la protection de la plante. D'après leur composition chimique et leur action physiologique, on distingue plusieurs groupes ayant des effets thérapeutiques variés [13].
- ❖ Les huiles essentielles: Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement utilisées en parfumerie. Les huiles essentielles sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés [23];[24];[13].
- ❖ Les résines: Ce sont des substances odorantes, colloïdales qui résultent de l'action de l'oxygène sur les terpènes. Les principales sont des oléorésines ou térébenthines en solution dans les essences [25].

- ❖ Les tanins: Toutes les plantes contiennent des tanins à des teneurs différentes. Ils donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail. Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur utilisation pour tanner les peaux [23];[24].
- ❖ Les gommes et mucilages: Ce sont des polysaccharides qui forment de véritables mosaïques moléculaires. Cette structure chimique leur confère la propriété remarquable de gonfler au contact de l'eau avec la formation de masses plastiques ou de solutions visqueuses. Ils agissent par action mécanique d'où l'effet laxatif. Le mucilage forme une couche protectrice sur la muqueuse intestinale contre les substances irritantes [25];[16].
- ❖ Les flavonoïdes: Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils possèdent de nombreuses vertus médicinales [23];[24].
- ❖ Les coumarines: Ce sont des lactones issues de la cyclisation des acides *o*-hydroxy-*Z*-cinnamiques. Largement distribuées dans le règne végétal, elles sont surtout abondantes chez quelques familles, notamment les Apiaceae et les Rutaceae. Structuralement, elles peuvent être simples ou polycycliques [22].
- ❖ Les saponines: Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (oestrogène, cortisone), et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale [23];[24].
- ❖ Les vitamines: Elles appartiennent au groupe des ergones et sont des substances sans valeur énergétique, mais indispensables en très petite quantité à un développement normal de la plante et au bon fonctionnement de

l'organisme humain. Certaines plantes sont particulièrement riches en provitamine A ou carotène, en vitamines B, C, E, K et P [25];[13].

- ❖ Les minéraux: De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Les salades consommées (*Brassica oleracea*) participent activement dans l'organisme comme plante thérapeutique [23];[24].

## 1.2. Etude botanique de la mélisse

### 1.2.1. Historique

Le nom de la mélisse dérive de sa racine indo-européenne, *mel*, qui signifie miel. En effet, la mélisse étant la plante préférée des abeilles (en grec, *melissophyllon* signifie feuilles pour les abeilles) [28].

Les apiculteurs des abords de la méditerranée avaient l'habitude d'en enduire les ruches afin que les abeilles ouvrières ne s'éloignent pas de leur demeure [7].

*M. officinalis* est une vieille plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs [26].

Elle sert de remède médicinal depuis plus de 2000 ans. Pline, dans son ouvrage *Naturalis historia*, et Dioscoride dans *Materia medica* ont été les premiers à rendre compte de l'action thérapeutique de la plante qui était surtout utilisée comme remède pour le cœur et l'estomac. Avicenne (980-1037) la recommandait parce que, disait-il, « elle rend le cœur joyeux » par la suite, il découvrit son action positive sur le tube digestif [4].

Elle a été importée en Espagne au X<sup>e</sup> siècle grâce aux Arabes et plus tard en Europe Centrale par l'intermédiaire des moines bénédictins [27].

Les feuilles de mélisse ont été utilisées traditionnellement depuis Théophraste et Hippocrate, puis au XV<sup>e</sup> siècle par Paracelse, pour améliorer les fonctions digestives et les états de nervosité [10].

Du XV<sup>e</sup> au XVII<sup>e</sup> siècle on utilisait principalement le distillat (eau de mélisse). Il correspond à un alcoolat distillé de mélisse. Ce dernier, associé au citron, la cannelle, la coriandre, le clou de girofle et la muscade est utilisé comme antispasmodique et stomachique [26];[27].

La mélisse est aussi utilisée dans l'industrie des liqueurs et des parfums [13].

### 1.2.2. Systématique et synonymes botaniques

La systématique de *Melissa officinalis* L selon QUEZEL et SANTA en 1962 est présentée dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1: Position systématique de *Melissa officinalis* [29].

Règne:	Plantae
Embranchement:	Spermaphytes
Sous- embranchement:	Angiospermes
Classe:	Magnoliopideae
Ordre:	Labiales (lamiales)
Famille:	Labiées (lamiaceae)
Genre:	<i>Melissa</i>
Espèce:	<i>Mélissa officinalis</i>

En 2003, l'APG II (Angiosperm Phylogeny Group) proposait une nouvelle classification phylogénique des Angiospermes (tableau 1.2) [30];[31].

Tableau 1.2: Classification phylogénétique de *Melissa officinalis* [30];[31].

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

On distingue les sous-espèces suivantes [27]:

Ssp. *Officinalis* (BRISQ)

Ssp. *Altissima* (ARCANG)

Ssp. *Inodora* (BORNM).

Un des synonymes de son nom d'espèce est *Melissa citriodorata* [32].

### 1.2.3. Dénominations vernaculaires

La mélisse est connue sous différentes dénominations:

- ✓ Berbère : Ferzizoua (feuille d'abeille), Ifer-zizwa, Tiffer n-tzizua (aile d'abeille), Taneqilet merzizua [32].

- ✓ Arabe : Touroudjan, Tindjan, Bararendjabouya, Hbaq t-trunj, Merzizou [1];[32].
- ✓ Français : Céline, Citronnade, Citronnelle, Piment des abeilles, Thé de France, Poincirade [33];[34].
- ✓ Anglais : Lemon balm, Bee balm [27].
- ✓ Allemand : Melisse, Zitronen-Melisse, Zitronenkraut, Citronelle, Bienenkraut, Honigblatt [27].

#### 1.2.4. Répartition géographique

##### a/ Dans le monde

La mélisse est une espèce originaire d'Europe centrale, orientale et méridionale. Fréquemment subsponnée en France [35].

Elle est spontanée dans l'Atlas marocain, notamment dans la région d'Agadir. On la trouve également en Tunisie et en Europe [32].

D'une manière générale dans les endroits rudéraux humides et ombragés [26].

##### b/ En Algérie

La mélisse est cultivée dans les régions de la Kabylie. Néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du Tell, où elle est signalée comme assez rare jusqu'en 1962. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen, les décombres, les endroits frais et les forêts, ainsi qu'aux alentours des maisons [32];[1];[2];[36].

#### 1.2.5. Description de la plante

Il s'agit d'une plante herbacée touffue (Figure 1.1), robuste et vivace, à rhizome court. Ce dernier porte de nombreux bourgeons adventifs qui servent à perpétuer et à multiplier la plante [27].

Elle est mollement hispide (possède des poils drus, mous et épais), au toucher elle est rugueuse (Figure 1.2). Elle est aromatique et très parfumée. Elle dégage une odeur agréable de citron caractéristique, obtenue par simple froissement des feuilles. Sa saveur est chaude, aromatique et légèrement amère [29];[32];[37].



Figure 1.1: Les jeunes pousses de la mélisse (originale).



Figure 1.2: Vue de *Melissa officinalis* L. [10].

a/ Tiges :

Elles sont dressées, très rameuses et érigées, à section quadrangulaire tel que présenté par la Figure 1.3 [38]. Elles sont ramifiées, glabres ou clairsemées de poils. Elles peuvent atteindre jusqu'à 90 cm de haut [27];[29].

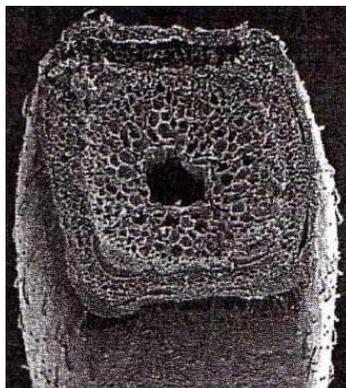


Figure 1.3: Coupe transversale de la tige quadrangulaire [38].

b/ Feuilles :

Elles sont plus ou moins pétiolées. Elles mesurent environ 8 cm de long et 5 cm de large. Elles sont largement ovoïdes, arrondies et presque cordiformes à la base. Elles sont opposée et décussée sur la tige. Le limbe fin, légèrement ridé, est de couleur vert foncé (parfois vert clair un peu jaunâtre) sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure. La fine nervure est fortement proéminente sur la face inférieure. Le bord de la feuille est irrégulièrement crénelé, dentelé et finement cilié. La face supérieure de la feuille est gaufrée, elle est faiblement pubescente. La face inférieure est presque glabre ou légèrement pubescente le long des nervures, mais finement ponctuée (Figure 1.4) [10].

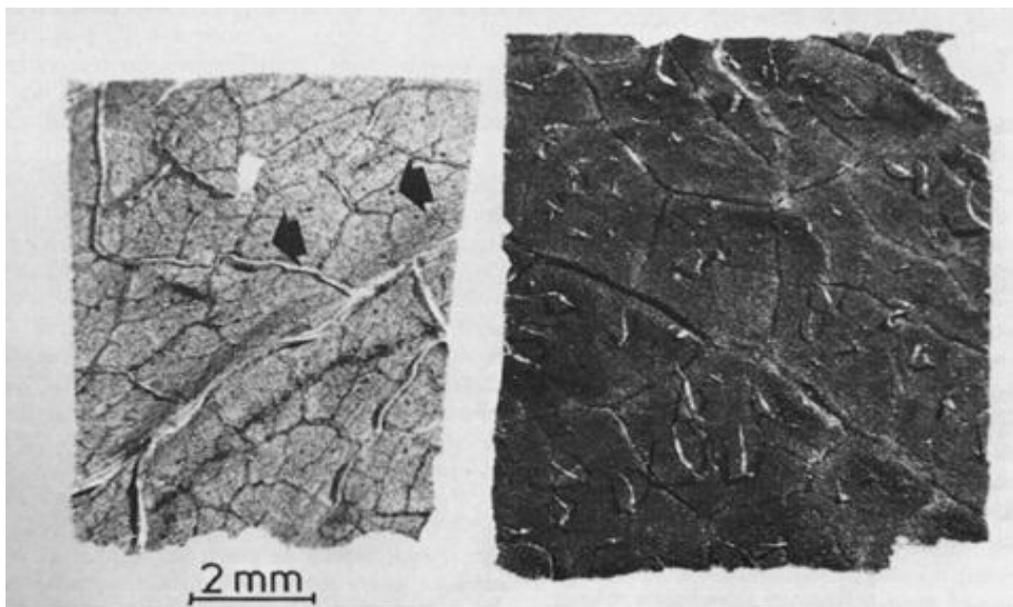


Figure 1.4: *Melissa officinalis*: face inférieure de la feuille, plus claire, à ponctuation glandulaire (flèche) et face supérieure plus foncée, à poils hérissés blanchâtres [10].

c/ Fleurs :

Elles sont regroupées en 3 à 5 faux verticilles assez compacts, mais espacés les uns des autres. Ces derniers sont placés sur des rameaux beaucoup plus courts que la feuille, à l'aisselle de laquelle s'insère le verticille (Figure 1.5).

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

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

Les étamines sont au nombre de 4 et fusionnent ensemble vers le haut. L'ovaire est supère et comprend 2 loges qui renferment chacune 2 ovules.

[27];[32];[1];[26];[39];[40];[41];[42].



Figure 1.5: Le regroupement des fleurs de *Melissa officinalis* L. [43].

d/ Fruit :

Il est visible au fond du calice persistant. C'est un tétrakène, d'environ 2 mm de long. Il est formé de 4 parties lors du développement de fausses cloisons (Figure 1.6). Il est lisse de couleur châtain, et il est formé d'éléments ovoïdes. Les graines sont luisantes, de couleur brun-noir [32];[27].

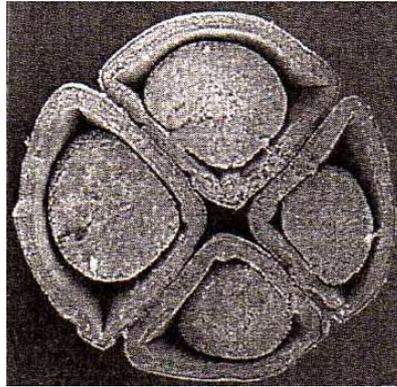


Figure 1.6: Tétrakène en coupe avec une graine par loge [38].

### 1.2.6. Culture

La mélisse demande un sol profond, lourd et riche en éléments nutritifs, bien travaillé et bien fumé. La culture de la mélisse demande une exposition ensoleillée et abritée [13].

Elle est peu tolérante et ne doit pas être cultivée après d'autres Lamiacées [27].

Elle pousse dans des endroits très ombrés [45].

La multiplication se fait par semis printaniers ou par division du rhizome [13].

Cette plante se ressème souvent seule [44].

La mélisse est sensible à la gelée et doit, de ce fait, être couverte durant l'hiver [13].

La mélisse est très sensible à une rouille des feuilles « *Septoria melissae* Deson » et à des proliférations d'escargots [45].

### 1.2.7. Récolte

La floraison se produit généralement à la deuxième année et s'étale de Juin à Septembre (à la fin de l'été) [27];[42].

Pour la conservation des feuilles séchées, la récolte de la tige feuillée s'effectue avant la floraison. On coupe la tige garnie de feuilles, pour les débarrasser des impuretés. On fait ensuite sécher ces feuilles rapidement à l'ombre dans un endroit frais à l'abri de la poussière.

Pour une utilisation des feuilles fraîches, ces dernières sont récoltées au moment de la floraison pour en retirer le maximum du potentiel thérapeutique [32];[15].

### 1.2.8. Conservation

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

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

La teneur en HE diminue rapidement ainsi, la plante ne doit pas être conservée au-delà d'un an [27];[2].

## 1.3. Les principes actifs de la mélisse

### 1.3.1. Composition chimique de la mélisse

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

Elle renferme également d'autres constituants minoritaires :  $\beta$ -caryophyllène dont la teneur peut atteindre jusqu'à 28% et au cours de la conservation elle se transforme en époxydes de  $\beta$ -caryophyllène I et II, germacrène D (jusqu'à 15%, mais pouvant aussi être absent), 6-méthylhept-5-ène-2-one (jusqu'à 9%), acétate de géranyle (jusqu'à 6%),  $\alpha$ -copaène (jusqu'à 5%), nérol (jusqu'à 5%), méthylcitronellal (jusqu'à 5%, mais pouvant être absent) et géraniol (Figure 1.7).

L'HE renferme également des composés volatils présents sous formes hétérosidiques comme des glycosides de citronellol, de phényléthanol, d'eugénol, de benzylalcool et d'oct-1-én-3-ol [10];[27].

b – Dérivés de l'acide hydroxycinnamique: Ils sont appelés aussi tanins de lamiacées. Leur teneur peut atteindre jusqu'à 7 %. Ils renferment l'acide rosmarinique, les acides caféique et chlorogénique, le 2-(3',4'-dihydroxyphényl)-1,3-benzodioxol-5-aldéhyde, les acides mélitriques A et B (trimères de l'acide caféique) [27].

c – Flavonoïdes: La teneur en flavonoïdes se situe entre 0,2 % et 0,7 %. Il s'agit des hétérosides de lutéoline, d'apigénine, de quercétine, de kaempférol, comme le lutéoline-3'-glucuronide, le cynaroside (lutéoline-7-O- glucoside), l'isoquercitrin (quercétine-3-O-glucoside), la cosmosiine (apigénine-7-O-glucoside) ainsi que l'rahmnazine (3,7-diméthoxykaempférol) et le 7-méthoxykaempférol [27].

d – Dérivés hydroxycoumariniques: éscultine [27].

e – Acides triterpéniques, notamment les acides ursolique ( $\approx$  0,3 %) et oléanolique [27].

f- Les vitamines : La mélisse contient de la vitamine C, de la vitamine E et du bêta-carotène [7].

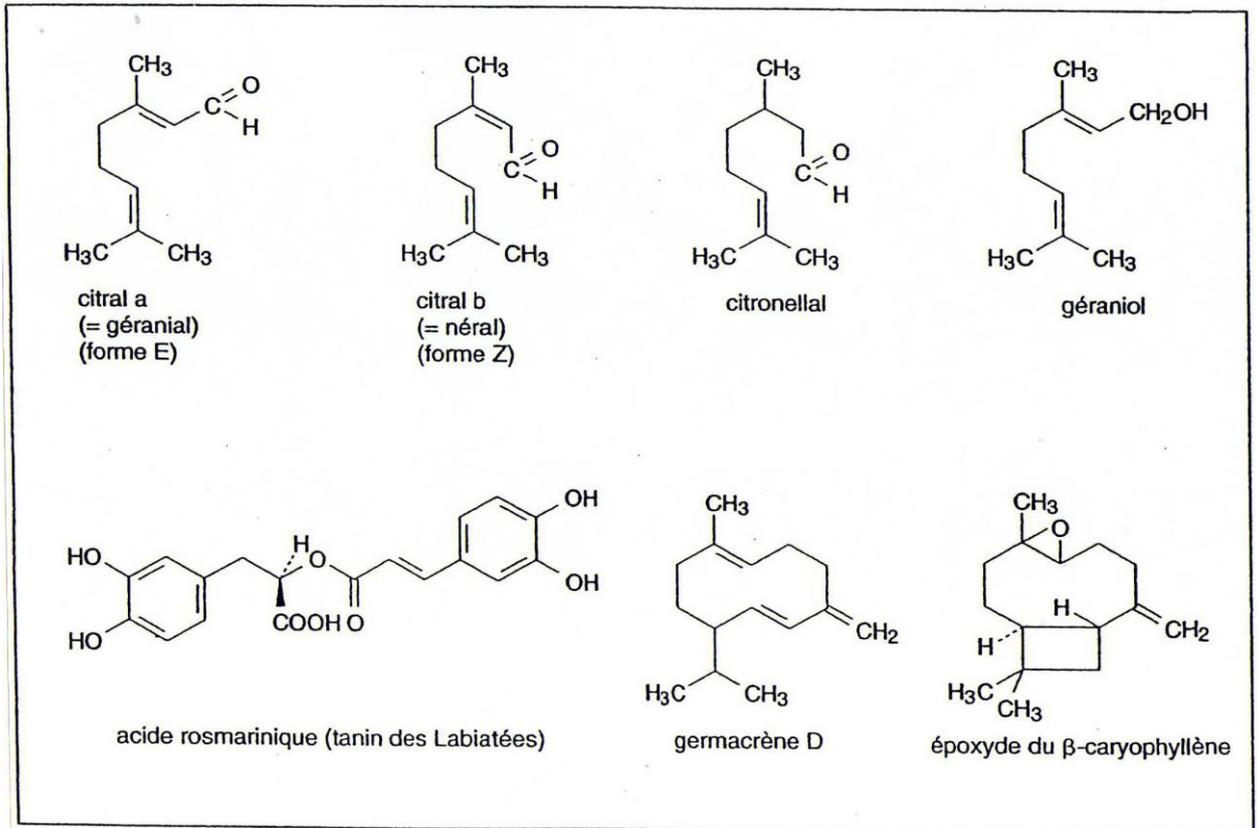


Figure 1.7: Structure chimique des principaux constituants de l'HE de mélisse [10].

### 1.3.2. Principales familles de métabolites secondaires chez *Melissa officinalis* L.

#### 1.3.2.1. Les huiles essentielles :

##### 1.3.2.1.1. Définition :

Selon la pharmacopée européenne, ce sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [23];[46].

##### 1.3.2.1.2. Localisation et formation :

Les HE, produites par les végétaux supérieurs, sont élaborées par des glandes sécrétrices (figure 1.8) qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, fleurs, racines, fruits, graines, écorces, etc) [46].

La synthèse et l'accumulation des HE s'accompagnent de structures histologiques spéciales, différenciées et variables suivant les familles botaniques. Elles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface des organes végétaux de la plante. On peut citer par exemple : les poils, les poches, les cellules et les canaux sécréteurs [46];[23].

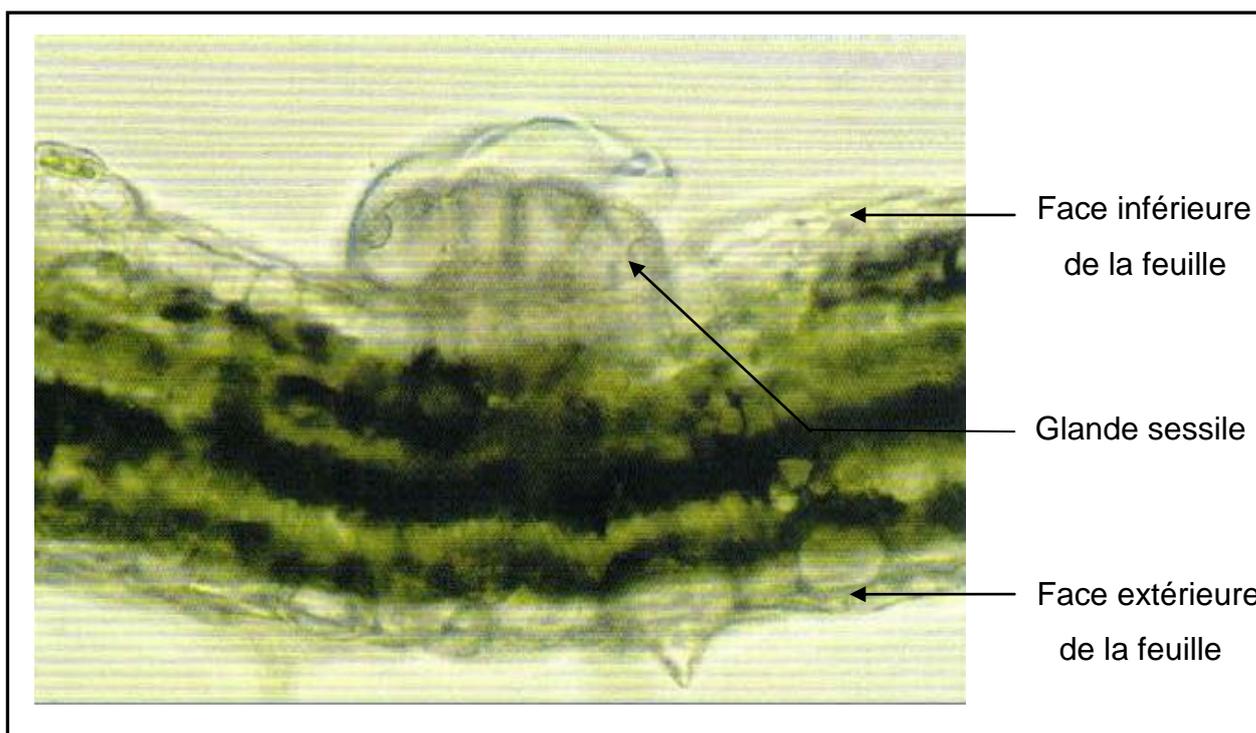


Figure 1.8: Coupe d'une feuille montrant la glande sessile, sécrétion sur la surface inférieure (CT, frais, non colorées, x375) [47].

#### 1.3.2.1.3. Procédés d'obtention des HE :

Les HE sont extraites de la matière végétale par différents procédés. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal et de son utilisation dans les diverses industries [46].

Les principales méthodes d'extraction sont représentées dans la figure 1.9.

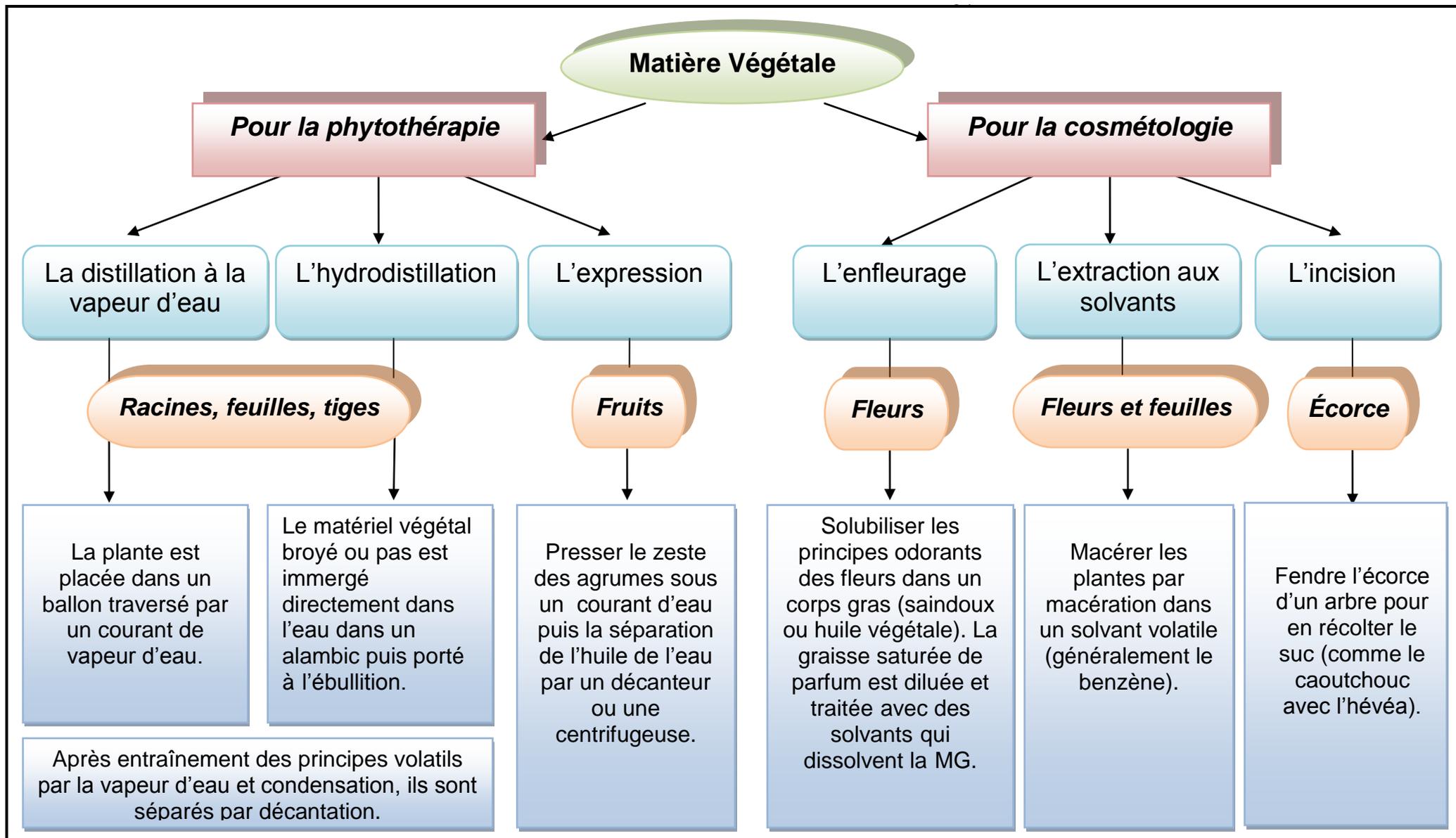


Figure 1.9 : Schémas récapitulatif des principales méthodes d'extraction des huiles essentielles [50][46 ][48][28] [49][12].

#### 1.3.2.1.4. Propriétés physiques :

Liquides à température ambiante et flacon ouvert, les HE sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles possèdent un indice de réfraction élevé et la majorité d'entre elles ont le pouvoir de dévier le plan de la lumière polarisée (le pouvoir spécifique) [23].

Elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (alcool, éther) et sont liposolubles.

Elles sont insolubles dans l'eau à laquelle toutefois elles communiquent leurs odeurs « eaux florales » [12].

#### 1.3.2.1.5. Composition chimique :

Les huiles essentielles sont complexes et possèdent une haute variabilité en matière de composition. Il s'agit d'un mélange de molécules variées. Elles comprennent en particulier des terpènes (hydrates de carbone non aromatiques) et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones).

De manière générale, les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biosynthétiques différentes : le groupe des terpénoïdes et celui des composés aromatiques qui dérivent du phénylpropane [46].

Certaines huiles essentielles contiennent des produits de dégradation de composés non aromatiques [23].

a) Les terpénoïdes : les huiles essentielles contiennent uniquement les terpènes volatils les plus importants, ceux dont le poids moléculaire n'est pas très élevé : les mono et les sesquiterpènes [23];[46].

b) Les composés aromatiques : ce sont des phénylpropanoïdes (C6- C3) qui sont moins communs que les terpénoïdes. On retrouve fréquemment des composés (C6- C1) telle la vanilline. Les lactones qui dérivent de l'acide cinnamique peuvent être entraînés par la vapeur d'eau et être retrouvés dans les huiles essentielles [23].

c) Les composés d'origine mucilagineuse : ces composés proviennent de la conversion des constituants non volatils et contribuent à la saveur des fruits. Ils peuvent exister dans les absolus et les concrètes. On les trouve dans les huiles essentielles lorsqu'ils sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau [23].

Il faut rappeler que la composition chimique peut varier d'un organe à un autre et pour une même plante, selon l'endroit où elle a été cultivée, l'ensoleillement qu'elle a reçu et l'époque à laquelle elle a été cueillie, la quantité de ses composants chimiques peut ne pas être totalement identique [48];[46];[12].

#### 1.3.2.1.6. Propriétés pharmacologiques :

a) Activité antiseptique : les huiles essentielles ont une activité antiseptique contre diverses bactéries pathogènes notamment les souches résistantes aux antibiotiques. Certaines huiles essentielles sont actives contre les levures et les champignons responsables des mycoses [23].

b) Propriétés spasmolytiques et sédatives : un grand nombre de plantes à huiles essentielles sont connues pour être efficaces dans la réduction ou la suppression de spasmes gastriques. Elles stimulent les sécrétions gastriques et améliorent la digestion. Aussi conduisent-elles à une diminution des troubles du sommeil, des troubles nerveux ou autres troubles psychosomatiques [23].

Hormis ces propriétés souvent communes, chaque huile peut présenter une ou plusieurs actions thérapeutiques plus spécifiques, parmi lesquelles : des propriétés cicatrisantes, améliore la circulation du sang, anti-inflammatoires, antirhumatismales, immunostimulantes, hormonales antitumorales [48].

Les HE peuvent servir à désintoxiquer en éliminant les toxines, néanmoins, certaines HE présentent des propriétés irritantes [23];[11].

### 1.3.2.2. Les tanins :

#### 1.3.2.2.1. Définition

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

Ce sont des substances amorphes, extraites de plantes. Elles sont utilisées principalement pour le tannage du cuir. Les meilleurs tanins sont issus de la noix de galle du chêne et des feuilles du sumac [51].

#### 1.3.2.2.2. Localisation

Les tanins se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale, ou concentrés dans des poches spéciales : les vacuoles à tanin. Ils colorent en brun rouge les organes qui les contiennent [52].

#### 1.3.2.2.3. Classification

Il existe deux catégories de tanins dans les plantes, tous deux d'origine biosynthétiques différentes :

- Les tanins hydrolysables : Ce sont des dérivés de l'acide gallique et d'autres acides polyphénoliques, ils résultent de l'estérification, des fonctions alcooliques du glucose. Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique. Les tanins hydrolysables donnent après hydrolyse de l'acide gallique ou de l'acide ellagique [53].
- Les tanins condensés : Ils sont aussi appelés tanins catéchiques ou proanthocyanidols. Ce sont des oligomères et des polymères d'aglycones polyphénoliques, dont la structure devient très vite complexe [10];[53].

#### 1.3.2.2.4. Les propriétés des tanins

Leur propriété principale est l'astringence tant en usage interne qu'en usage externe. Il est démontré que les tanins possèdent des activités antimicrobiennes, antivirales et hypoglycémiantes. Ils sont utilisés comme contre-poison des métaux lourds et des alcaloïdes. Ils s'utilisent dans l'industrie mais plus particulièrement dans celle du cuir, des vernis et peintures. En pharmacie, leur action astringente est utilisée comme antidiarrhéique, hémostatique, vasoconstricteur, protecteur veineux dans le traitement des hémorroïdes et des varices. En cosmétologie, les tanins s'utilisent sous forme de lotions astringentes [54].

Les tanins ont également une activité anti-oxydante. Ce sont des inhibiteurs enzymatiques aspécifiques. Leur surconsommation peut cependant engendrer peu à peu une anémie de type hémolytique. Certains tanins ellagiques provoquent une mutagénéicité de certains carcinogènes [23];[10].

#### 1.3.2.3. Les flavonoïdes :

##### 1.3.2.3.1. Définition

Les flavonoïdes ou phénylchromones sont des substances polyphénoliques possédant un certain nombre de phénols libres ou stabilisés par un sucre. Ce sont des hétérosides très répandus chez certaines dicotylédones. Ils sont présents dans tous les organes principalement dans les feuilles et les boutons floraux. Ce sont des pigments jaunes utilisés comme teinture pour les tissus [54].

##### 1.3.2.3.2. Localisation

Les formes glycosidiques des flavonoïdes varient en fonction des espèces. Les flavonoïdes sont hydrosolubles. Ils s'accumulent dans les vacuoles. Ils peuvent être concentrés dans l'épiderme et le mésophylle des feuilles. Dans les fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques. Les flavonoïdes ont toujours été détectés sous forme d'aglycones libres lipophilliques au niveau de la

cuticule foliaire. Cette état est présent particulièrement pour les plantes des régions arides et semi-arides [23].

#### 1.3.2.3.3. Les principaux types de flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, car ils partagent le même squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles en C<sub>6</sub> reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> [56];[55].

Parmi les flavonoïdes présentant le plus d'intérêt, nous citerons [57] :

\* *Les anthocyanes*, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour les divers pH : du rouge-orange en milieu acide au bleu-mauve en milieu alcalin.

La formation des anthocyanes est favorisée par la lumière et par les basses températures (ceci explique la pigmentation souvent éclatante des plantes de montagne).

\* *Les proanthocyanidols*, incolores, se rencontrent fréquemment dans les tiges et dans les feuilles.

\* *Les flavonols*, et pour une moindre part, *les chalcones* et *les aurones* colorent certaines fleurs en jaune, bien que la couleur jaune de la plupart des fleurs soit due à des caroténoïdes.

\* *La roténone* et *les roténoïdes*, principes insecticides des *Derris* et des *Lonchocarpus*, sont des substances complexes pentacycliques que l'on considère comme dérivant d'un noyau isoflavone.

#### 1.3.2.3.4. Extraction

L'extraction des flavonoïdes s'effectue par l'alcool. Les solutions alcoolisées obtenues subissent une évaporation. Le résidu est repris par l'eau chaude puis épuisé par des solvants. Ce sont des solides cristallisés de couleur variable allant du blanc ivoire au jaune vif [54].

#### 1.3.2.3.5. Rôle physiologique et biologique

De nombreux flavonoïdes, en raison de leur richesse en groupes phénol, sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques. Ils interviendraient à différents stades du développement, notamment lors de la germination.

Les flavonoïdes, dont l'absorption en UV est importante, protègent la plante vis-à-vis des rayonnements nocifs.

En donnant leur couleur aux fleurs et aux fruits, ils participent aux processus de pollinisation et de dispersion.

Au niveau des feuilles, ils ont un rôle attractif ou répulsif sur les insectes entraînant ou non la consommation du feuillage [57].

#### 1.3.2.3.6. Propriétés pharmacologiques

Les flavonoïdes sont essentiellement utilisés dans le domaine capillaro-veineux. Seuls ou associés à d'autres composés, ils constituent des vasculoprotecteurs et des veinotoniques. Ils agissent par diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (action vitaminique P) [54].

Ils sont connus pour leur activité anti-oxydante et anti-inflammatoire [23].

Ils sont indiqués principalement dans le traitement des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau (pétéchies, ecchymoses) ainsi qu'au niveau des muqueuses (épistaxis, gingivorragies). Ils sont recommandés dans le traitement des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire, dans celui des métrorragies liées aux dispositifs intra-utérins et des troubles liés à la circulation rétinienne et/ou choroïdienne en association avec d'autres médicaments. Enfin, ils sont utilisés dans le traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolymphatique : œdèmes, paresthésies, crampes, jambes lourdes [54];[23];[56].

## 1.4. La mélisse et la thérapie

### 1.4.1. Les vertus thérapeutiques de la mélisse

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

La saveur aromatique de cette plante provoque une stimulation réflexe des sécrétions salivaires, gastriques et biliaires à l'origine de ses propriétés apéritives et digestives [27];[1].

Actuellement, les phytomédicaments à base de mélisse utilisés par voie orale peuvent revendiquer trois indications, utilisés:

- 1° dans le traitement symptomatique de troubles digestives tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulence;
- 2° comme traitement adjuvant de la composante douloureuse des troubles fonctionnels digestifs;
- 3° dans le traitement symptomatique des états neurotoniques des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil [23].

Les feuilles de mélisse et les préparations correspondantes, sédatives et spasmolytiques, sont utilisées en outre en cas de symptômes cardiaques d'origine psychovégétative, de douleurs vésiculaires et de dysménorrhées. En psychiatrie, la plante est utilisée non seulement pour traiter les troubles du sommeil, mais également comme anxiolytique [32];[27];[34].

L'HE a des effets antibactérien et antifongique. Elle est également responsable des propriétés spasmolytiques reconnues à la plante [23].

Ainsi, la médecine populaire recourt à la mélisse dans le traitement de l'hystérie et de la mélancolie, en cas de catarrhes bronchiques d'origine nerveuse et de vomissements, de migraines, de faiblesses nerveuses, et pour calmer les céphalées, les douleurs dentaires et auriculaires et enfin pour lutter contre l'hypertension [4].

L'infusion de la même plante peut être utilisée pour nettoyer et tonifier la peau du visage [7].

En cosmétologie, l'extrait alcoolique de mélisse réduit la production de pellicules [32].

#### 1.4.2. Doses et modes d'administration

Elle s'utilise sous forme d'infusion, de teinture, de vin médicinal et d'eau antihystérique dans tous les cas où il convient d'intervenir pour calmer les douleurs et les nerfs [15].

On en fait surtout usage en infusion théiforme à raison d'une dose de 1,5 à 4,5g de plante par tasse à boire plusieurs fois par jour [27].

En usage externe, la mélisse réduite en poudre est utilisée comme sternutatoire, contre les maux de tête [1].

Des extraits ainsi que l'HE peuvent aussi être employés sous forme de bains en cas d'inflammations cutanées et de troubles neurovégétatifs, ainsi qu'en compresses et en pommades pour le soin d'infections cutanées comme l'herpès labial [27].

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

Pour la stimulation de la mémoire, prenez durant 10 jours par mois 3 tasses par jour d'une infusion de 30 g de sommités fleuries et de feuilles par litre d'eau [6].

#### 1.4.3. Effets indésirables et contre-indication

Aucun effet secondaire, ni aucune interaction avec d'autres médicaments ou plantes médicinales, n'ont été rapportés à ce jour [58].

Aucune toxicité aiguë ou chronique n'est signalée lorsque la mélisse est utilisée comme condiment ou en infusion, aux doses usuelles. Le potentiel de sensibilisation de la plante est faible. Aucun cas de réaction allergique n'est signalé [27].

Cependant, il est préférable d'en éviter l'usage prolongé du fait de son action anticonvulsivo-antagoniste [34].

L'innovation doit faire peur, car ces substances riches en molécules lipophiles ont un tropisme neurologique évident. Rappelons aussi le vieil adage de Paracelse: « C'est la dose qui fait le poison » [27].

Un contact prolongé avec des plantes ou des feuilles de baume peut causer une dermatite de contact (démangeaisons, brûlures, rougeurs ou de la peau boursouflée) ou il peut rendre sensible à d'autres allergènes [37].

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Matériels

##### 2.1.1. Matériel biologique

###### 2.1.1.1. Matériel végétal

Vu sa disponibilité en Algérie et son utilisation par les herboristes comme plante à caractère thérapeutique, *Melissa officinalis* L. a fait l'objet de notre étude.

#### \* Récolte:

- La plante a été récoltée dans la localité de Hammam Melouane, wilaya de Blida - Algérie.
- La récolte a été effectuée sur les parties aériennes (tige – feuilles) de la plante au mois de mai 2009, avant la floraison.
- Les fleurs ont été récoltées à la fin du mois de juin 2009.

#### \* Séchage et broyage:

- Pour l'étude botanique ainsi que la détermination de la teneur en eau, nous avons utilisé des échantillons à l'état frais.
- Pour les analyses phytochimiques, le séchage de la plante a été effectué naturellement à l'abri de la lumière et de l'humidité sur du papier (Figure 2.1), durant 15 jours.
- Pour la réalisation de certains tests et extractions, une partie du matériel végétal séché a été broyée à l'aide d'un broyeur (moulin à café), afin d'obtenir une poudre fine.



Figure 2.1: Séchage de *Melissa officinalis* L. (Original, 2009)

#### 2.1.1.2. Matériel bactériologique

Six (06) bactéries (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) et une levure (*Candida albicans*) ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines.

Les souches testées sont identifiées et référencées par le laboratoire de stérilité du Complexe Antibiotical - SAIDAL.

#### 2.1.2. Matériel non biologique

- Cf. Appendices B et C.

### 2.2. Méthodes

#### \* Lieux d'expérimentation

Nos essais expérimentaux ont duré une année (du mois de juin 2009 au mois de juin 2010). Ils ont été réalisés au niveau :

- ✓ Laboratoire de recherche post-graduation de biologie végétale du département de biologie de l'université Saad Dahleb de Blida ;
- ✓ Laboratoire de chimie organique du département de chimie industrielle de l'université Saad Dahleb de Blida ;
- ✓ Laboratoire de biologie végétale du département d'agronomie de l'université Saad Dahleb de Blida ;
- ✓ Laboratoire central de la police scientifique et technique d'Alger.

### 2.2.1. Identification botanique de la plante

L'identification de la plante a été faite au niveau du Parc National de Chréa (Direction de Blida) et au laboratoire de botanique du département d'Agronomie de l'université de Blida.

Elle a été confirmée au département de botanique de l'Ecole National des Sciences Agronomiques (ENSA) d'El Harrach – Alger en comparaison avec les spécimens de l'herbier.

Pour chercher des spécificités morphologiques et anatomiques de la plante et localiser éventuellement les sites sécréteurs des essences aromatiques, une étude de l'aspect macroscopique (observation des différents organes de la plante) et microscopique a été réalisée.

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

### 2.2.2. Etude phytochimique de *Melissa officinalis* L.

#### 2.2.2.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau de la plante a été déterminée par le procédé de séchage des échantillons de poids déterminés dans une étuve ventilée à 60°C.

Les échantillons ont été pesés avant de les placer dans une étuve ventilée à une température de 60°C. Par la suite, des pesés ont eu lieu, toutes les 24 H jusqu'à obtention d'un poids constant [59];[60]. Ainsi, la teneur en eau de la plante a pu être déterminée

La teneur en eau a été calculée comme suit :

Considérons :  $P_1$  → poids de l'échantillon « plante fraîche ».

$P_2$  → poids de l'échantillon « plante sèche ».

$T$  → teneur en eau exprimée en % de poids frais.

$$T = (P_1 - P_2) / P_1 \cdot 100$$

Pour plusieurs mesures, on calcule la teneur moyenne :

$i=1, \dots, n$ .  $n$  : nombre total des échantillons.

moy : moyenne.

$T_1$  : teneur en eau de l'échantillon N°1.

$T_2$  : teneur en eau de l'échantillon N°2.

.....  
↓  
.....

$T_n$  : teneur en eau de l'échantillon N°n.

$$T (\text{moy.}) = [ \sum_{i=1}^n P_{1i} - \sum_{i=1}^n P_{2i} ] / \sum_{i=1}^n P_{1i} \times 100$$

ou

$$T (\text{moy.}) = T_1 + T_2 + \dots + T_n / n$$

#### 2.2.2.2. Détermination de la teneur en cendres

La teneur en cendres donne une indication sur la quantité de minéraux (non combustibles) contenus dans la plante. Elle a été déterminée selon le procédé du chauffage de l'échantillon au dessus de son point de fusion pour l'élimination des constituants carboniques [61].

Il consiste à incinérer la poudre de la plante et aboutir à sa calcination jusqu'à l'obtention des cendres blanches. En l'occurrence, dans chacun des 3 creusets en porcelaine préalablement tarés, a été introduite une prise d'essai de 1

à 2g de poudre de plante séchée et finement broyée. Ensuite, ces creusets sont mis en incinération dans le four à moufle à une température de 450 à 500 °C pendant 4h (jusqu'à disparition de toute tache noire) [62];[63];[64].

Un refroidissement pendant 24h est obligatoire avant de peser.

Le taux des cendres est exprimé en % par rapport à la masse initiale de plante. Il a été calculé comme suit:

Considérons : P → poids de l'échantillon « poudre de plante ».  
 $P_{c-e}$  → poids du creuset avec l'échantillon (cendres).  
 $P_c$  → poids du creuset vide.  
 T → teneur en cendres exprimée en % de poids sec.

$$T = (P_{c-e} - P_c) / P \times 100$$

$$T \text{ (moy.)} = T_1 + T_2 + T_3 / 3$$

### 2.2.2.3. Etude des principes actifs de *Melissa officinalis* L.

Nous avons procédé à l'extraction, dosage et étude des constituants majoritaires volatils et non volatils de *Melissa officinalis* L.

Nous avons utilisé trois méthodes pour l'extraction, à savoir:

- \* Extraction solide - liquide continue (entraînement à la vapeur d'eau – extracteur de soxhlet);
- \* Extraction solide - liquide discontinue (macération);
- \* Séparation liquide - liquide (décantation).

#### 2.2.2.3.1. Étude des composés volatils

##### 2.2.2.3.1.1. Extraction de l'HE de Mélisse par entraînement à la vapeur d'eau

###### a- Principe

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* a été extraite par le système d'entraînement à la vapeur.

Il s'agit d'une distillation continue en circuit fermé pendant un temps suffisant pour entraîner la totalité de l'huile essentielle contenue dans la plante. Les vapeurs en traversant la plante font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmonte l'eau dans l'ampoule de décantation.

#### b- Mode opératoire

Le dispositif utilisé pour l'extraction par entraînement à la vapeur est illustré par la figure 2.2.

La procédure d'extraction se résume à allumer le chauffe-ballon et porter l'eau à ébullition. La vapeur dégagée (après avoir piéger l'eau distillée dans la première ampoule à décanter) traversera un ballon de 1L contenant la matière végétale (environ 120g) qui dégagera ainsi toutes les substances volatiles dans une durée de 1 à 2 h.

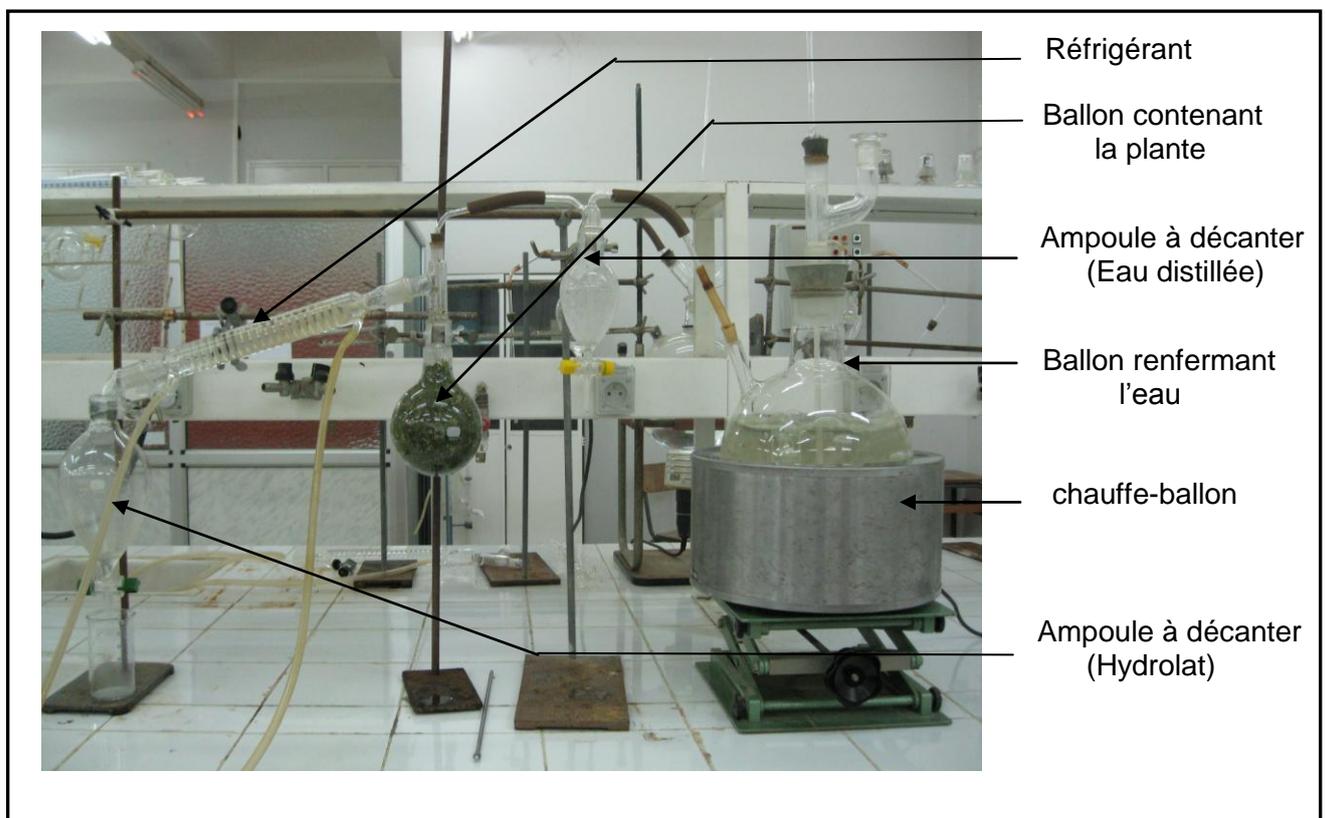


Figure 2.2: Montage de l'entraînement à la vapeur (Original, 2009).

Le réfrigérant en serpentin alimenté par un système de refroidissement "le cryostat", permet la condensation et la liquéfaction de la vapeur ayant emprisonné les substances. Cette dernière constituera l'hydrolat recueilli dans l'ampoule à décanter.

Vu le rendement faible en HE de la mélisse, ce cycle a été répété plusieurs fois.

Pour la récupération de l'HE de la phase aqueuse de l'hydrolat nous avons procédé à la séparation liquide-liquide avec un solvant organique, éther diéthylique, sélectionné pour son affinité vis-à-vis des HE.

Après la décantation, la phase organique est récupérée et débarrassée de toutes traces d'eau par du sulfate de magnésium anhydre. L'utilisation d'un évaporateur rotatif permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'HE.

#### c- Rendement de l'opération

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter [65].

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

Considérons : R → rendement de l'HE en %.  
 $P_H$  → poids de l'HE en g.  
 $P_A$  → poids de la plante traitée en g.

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

ou

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

#### d- Contrôle organoleptique de l'HE

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

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

### 2.2.2.3.1.2. Analyse de l'huile essentielle par CG-MS

#### a- Principe

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

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

- Ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température;
- Accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation;
- Détection et traitement du signal à la sortie de l'appareil ce qui conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse et charge  $m/z$
- Identification par une comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs "banques de données" de référence [66]; [67].

Les systèmes modernes sont généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés [68].

#### b- Mode opératoire

Le protocole utilisé dans cette étape est celui adopté au laboratoire central de la police scientifique et technique d'Alger.

L'huile récupérée est analysée par la technique de couplage CG/MS, en mode électron-impact (E.I.). Le type d'appareil utilisé est un HP 6890N couplé à un spectromètre de masse 5973N d'Agilent Technologies, de série Masse Sélective détecteur énergie d'ionisation 70 eV, voltage de multiplicateur 1500 à 2000 V. La CG est muni d'un injecteur Split, d'une colonne en silice fondue remplie d'une phase stationnaire HP-1 (méthylsilicone). Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml / min.

La séparation chromatographique est faite sur une colonne HP-5 (30 m x 0,32 mm. D x 0,25  $\mu\text{m}$  film thickness). La température de la colonne est programmée de 37 à 250 °C à raison de 2 °C.min<sup>-1</sup>

#### 2.2.2.3.2. Étude des composés non volatils polaires et apolaires

##### 2.2.2.3.2.1. Extraction au soxhlet

###### a- Principe

L'extraction solide-liquide peut aussi être réalisée par un appareil spécial, extracteur de soxhlet. L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (Figure 2.3) [69];[70].

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération [71].

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté [72];[73].

###### b- Mode opératoire

Introduire 40 g de poudre de la plante dans la cartouche en papier filtre, cette dernière sera placée dans le soxhlet surmonté d'un réfrigérant. Verser 500 ml d'éther de pétrole dans un ballon et porté à ébullition après la réalisation du montage illustré par la figure 2.3.

Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction, le matériel végétal est toujours en contact avec le solvant fraîchement distillé.

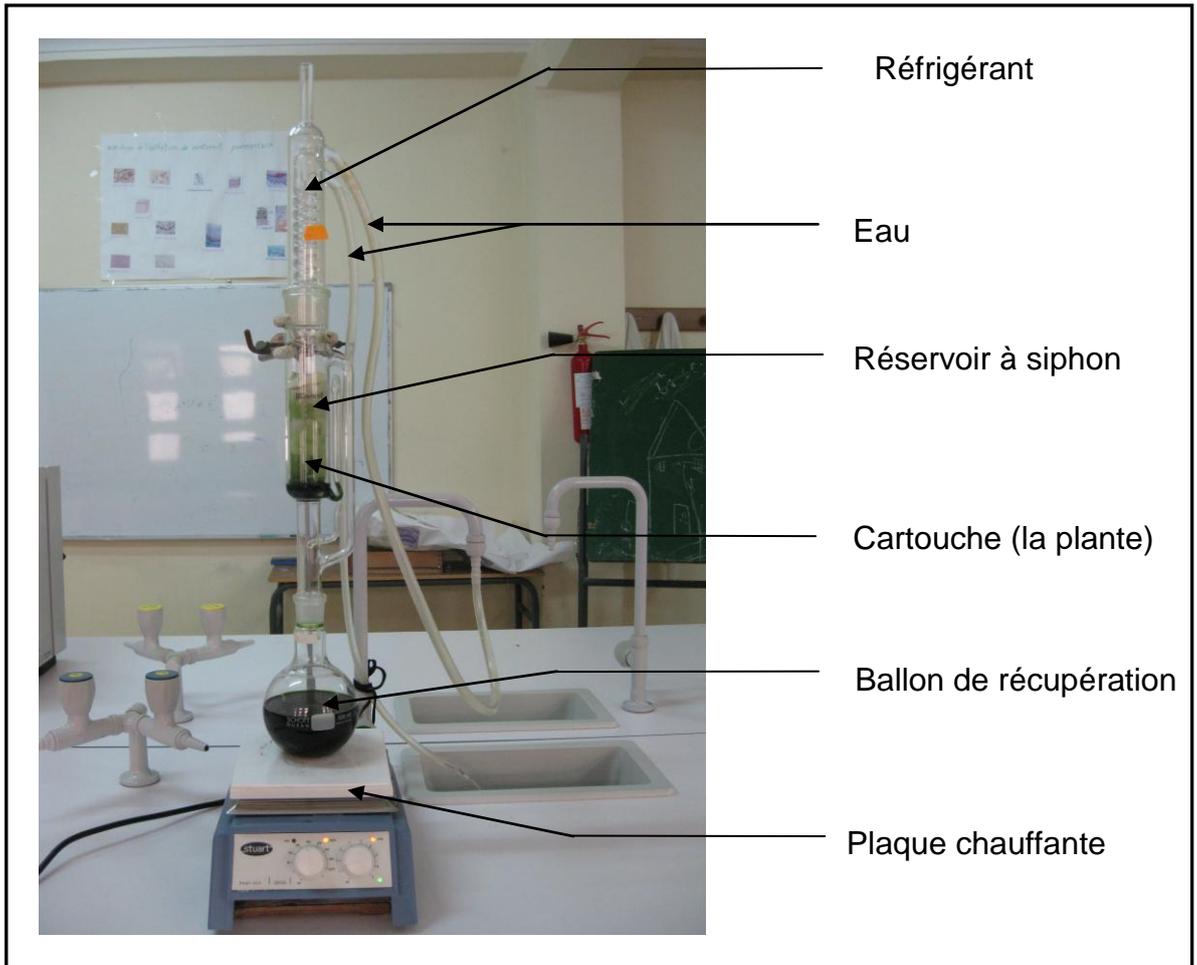


Figure 2.3: Système d'extraction au soxhlet (Original, 2010)

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons dans le ballon le solvant enrichi en substances solubles. Après concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif nous obtenons la fraction lipidique.

Le marc dégraissé par l'éther de pétrole est repris par le méthanol selon le même protocole (extraction au soxhlet) pour récupérer la fraction polaire (Figure 2.4).

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions.

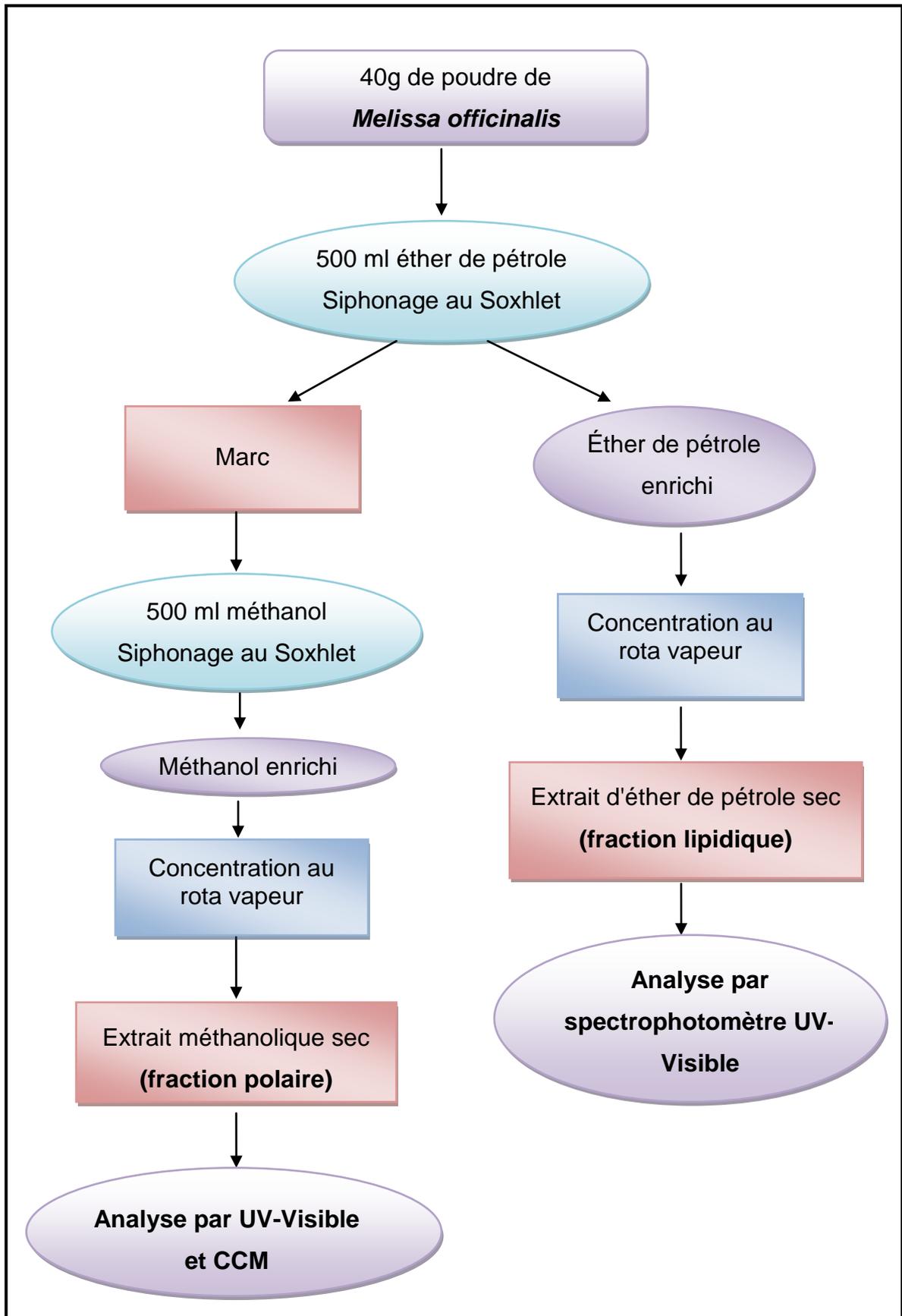


Figure 2.4 : Protocole expérimental de l'extraction des composés non volatils polaires et apolaires par Soxhlet.

#### 2.2.2.3.2.2. Analyse des fractions polaire et apolaire par Spectrophotomètre UV-visible

##### a- Principe

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides. Ce sont des méthodes quantitatives et qualitatives de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe la lumière à une longueur d'onde bien déterminée, appartenant au domaine UV-visible (de 200 à 800 nm).

La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins [73].

##### b- Mode opératoire

Dans notre étude, cette technique a été utilisée pour déterminer la présence de groupements fonctionnels actifs des concrètes et confirmer ainsi la réussite de l'extraction.

Les deux fractions apolaire (par l'éther de pétrole) et polaire (par le méthanol) sont reprises dans quelques ml du solvant approprié et sont soumises à un balayage en spectrophotométrie entre 220 et 800 nm.

#### 2.2.2.3.2.3. Analyse de la fraction polaire (méthanolique) par CCM

Le but de cette analyse est la caractérisation des composés contenus dans l'extrait méthanolique.

##### a- Principe

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle est utilisée pour séparer et identifier les métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits tels que les mélanges complexes de

métabolites et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction.

Les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés (Figure 2.5) [73].

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son  $R_f$  (Rate factor ou Rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1 [68].

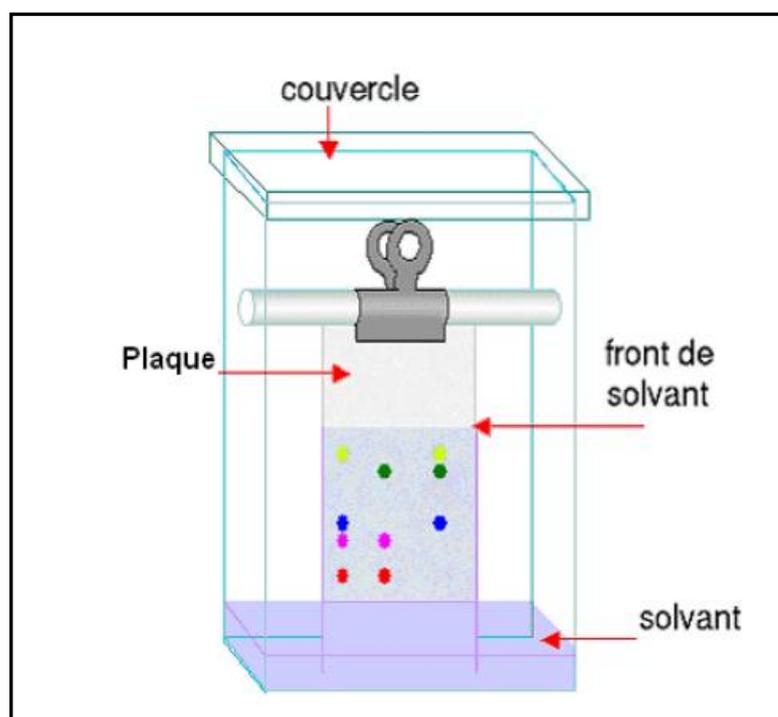


Figure 2.5. Schéma du développement chromatographique d'une plaque [73].

#### b- Mode opératoire

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de silicagel, de 2/10 cm. Dans notre expérimentation, nous avons utilisé un becher couvert.

Nous avons préparé la phase mobile constituée par le mélange eau distillée, acide acétique et butanol dans les proportions suivantes, 5V; 1V; 4V.

Le spot de 10 µl de l'extrait solubilisé en méthanol a été déposé au centre à 1 cm du bord inférieur de la plaque.

Dès que l'éluant migrant par capillarité sera à 1 cm du bord supérieur de la plaque, nous arrêtons la migration.

Les plaques sont ensuite séchées à l'étuve puis vaporisées par les révélateurs adéquats (Tableau 2.1).

Tableau 2.1: Les révélateurs et les métabolites recherchés dans la concrète polaire de *Melissa officinalis*.

Réactifs de révélation	Métabolites caractérisés	Couleur des spots (résultat positif)
Chlorure ferrique FeCl <sub>3</sub> 1%	Tanins et acides phénols	Brun verdâtre à noirâtre
Chlorure d'aluminium AlCl <sub>3</sub> 2%	Flavonoïdes	Brun verdâtre ou rose orangé
Potasse alcoolique 5%	Coumarines	Jaune verdâtre

#### 2.2.2.3.3. Extraction de certains principes actifs de *Melissa officinalis* L

##### \* Principe:

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante [73];[69].

Nous avons effectué l'extraction des tanins et flavonoïdes de *Melissa officinalis* de cette manière.

##### 2.2.2.3.3.1. Extraction et détermination de la teneur en tanins

###### a- Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des tanins est illustré par la figure 2.6.

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

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

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

Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous vide pour obtenir un résidu sec. C'est un extrait pur de tanins qui sera pesé [23].

#### b- Détermination quantitative

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

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

Considérons :  $m_t$  → masse de l'extrait sec des tanins en g.  
 $m_v$  → masse de poudre végétale à extraire en g.  
 $P_1$  → poids du ballon vide en g.  
 $P_2$  → poids du ballon avec l'extrait sec des tanins en g.  
 $T_t$  → teneur de la drogue en tanins en % / g de poids sec.

$$m_t = P_2 - P_1$$

$$T_t = (m_t / m_v) \times 100$$

#### c- Analyse des tanins par CCM

Le mode opératoire pour la caractérisation des tanins est identique à celui utilisé dans l'analyse de la fraction polaire. Néanmoins une différence réside dans la révélation, celle ci est réalisée par vaporisation d'une solution de chlorure ferrique aqueux à 1%.

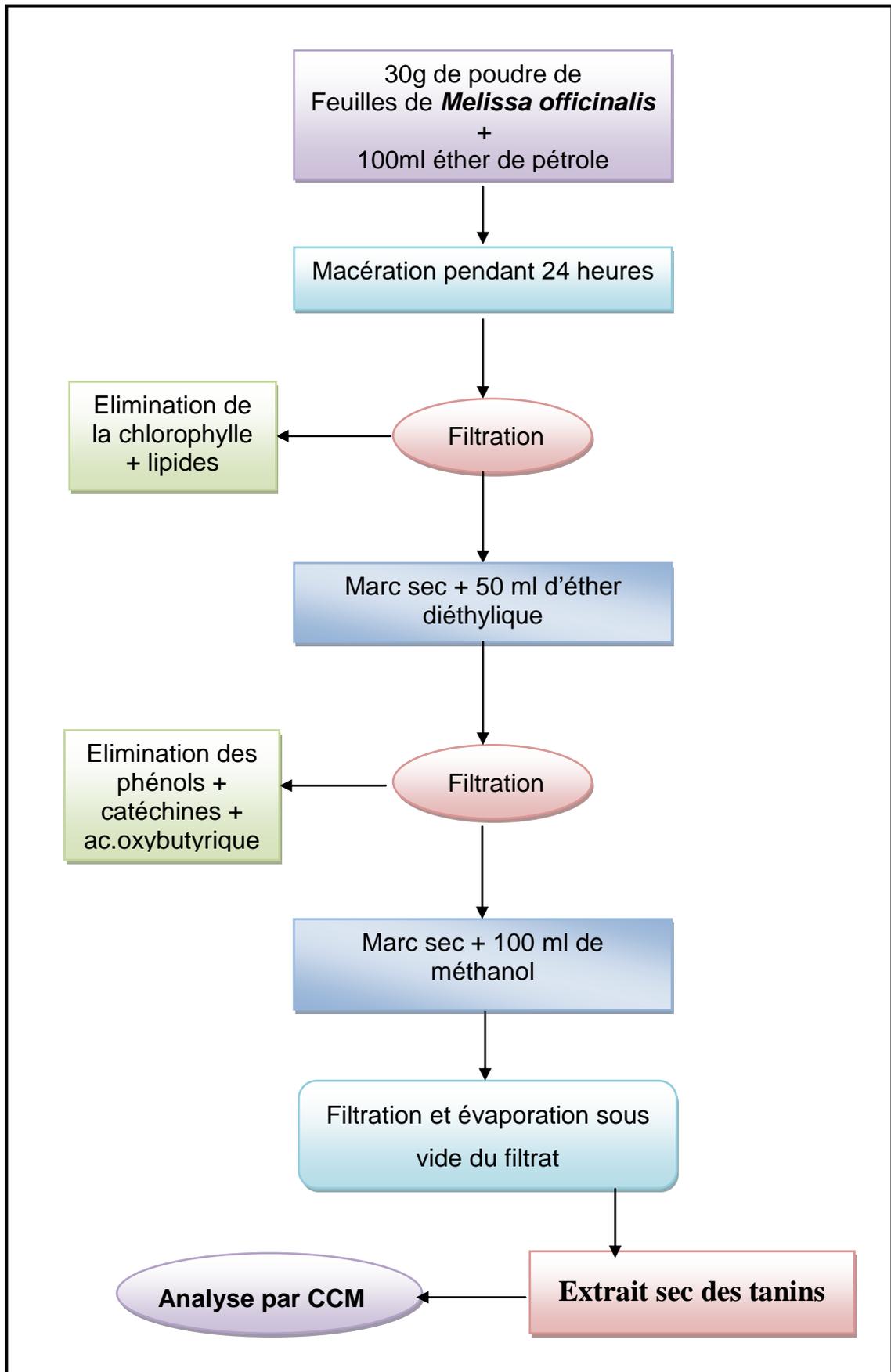


Figure 2.6 : Protocole expérimental de l'extraction des tanins.

### 2.2.2.3.3.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes

#### a- Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des flavonoïdes est illustré par la figure 2.7 [74].

#### \* Macération:

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

#### \* Extraction liquide-liquide:

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

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

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

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

### b- Détermination quantitative

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

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

Considérons :  $m_f$  → masse de l'extrait sec des flavonoïdes en g.  
 $m_v$  → masse de poudre végétale à extraire en g.  
 $P_1$  → poids du ballon vide en g.  
 $P_2$  → poids du ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes en g.  
 $T_f$  → teneur de la drogue en flavonoïdes en % / g de poids sec.

$$m_f = P_2 - P_1$$

$$T_f = (m_f / m_v) \times 100$$

### c- Analyse des flavonoïdes par CCM

Le mode opératoire pour la caractérisation des flavonoïdes est identique à celui utilisé dans l'analyse de la fraction polaire. Néanmoins une différence réside dans la révélation, celle ci est réalisée par vaporisation d'une solution de chlorure d'aluminium à 2 % dans l'alcool à 95 %.

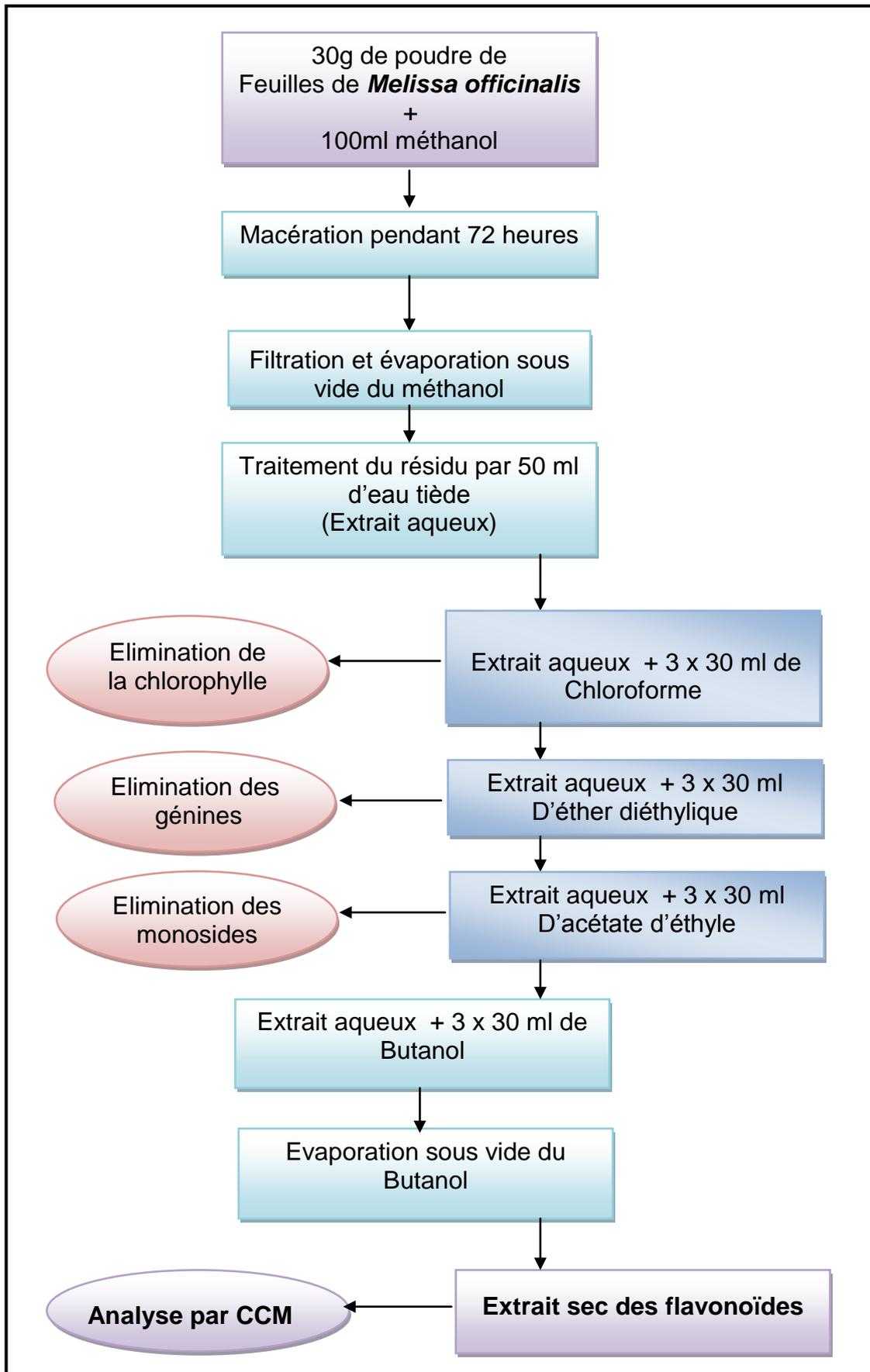


Figure 2.7 : Protocole expérimental de l'extraction des flavonoïdes.

### 2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Melissa officinalis*

Le pouvoir antioxydant des échantillons extraits de la mélisse à savoir la concrète polaire (méthanolique) et l'HE a été testé *in vitro* par la méthode de DPPH.

Les résultats seront comparés par rapport à un ou plusieurs témoins positifs. Ces témoins positifs sont souvent des antioxydants de synthèse qui sont actuellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

Les antioxydants utilisés dans notre étude comme témoins positifs sont le tocophérol et l'acide gallique.

#### a- Principe

Le DPPH: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$  ; Mr: 394.33) est un radical libre stable (Figure 2.8) en solution il donne une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle [75];[76].

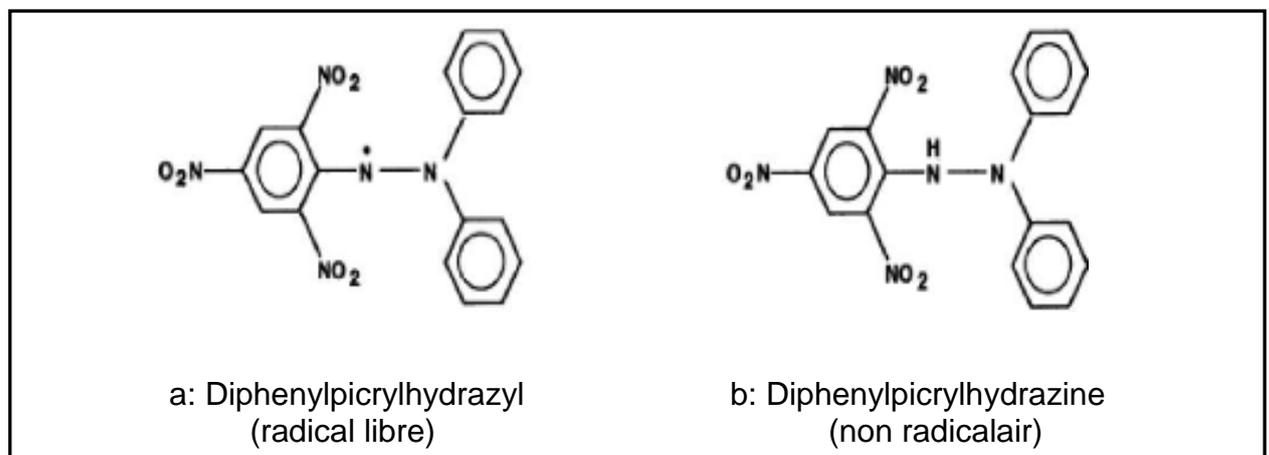


Figure 2.8: Forme libre et réduite du DPPH [77].

La capacité de céder des hydrogènes par les HE ou par certains composés purs, est mise en évidence par la méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique ou éthanolique qui contient le radical libre DPPH\* [78].

#### b- Mode opératoire

Le test utilisant le DPPH\* a été réalisé en suivant la méthode décrite par Sanchez-Moreno et al. [79];[78].

##### \* Préparation de la solution alcoolique de DPPH

Le DPPH est solubilisé dans du méthanol absolu c'est à dire dans le même type de solvant que celui utilisé pour préparer l'échantillon et ses dilutions.

On prépare 100 ml d'une solution 60  $\mu$ M de DPPH ce qui correspond approximativement à 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

##### \* Préparation des solutions d'extraits

Pour tous les extraits, que ce soit concrète polaire ou HE et même les témoins, on prépare des solutions dans le méthanol absolu à raison de 1000 mg/l. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour obtenir différentes concentrations. D'autres concentrations plus élevées ont été rajoutées pour la préparation huileuse.

##### \* L'essai au DPPH

Dans chaque tube sec et stérile, on introduit 2 ml de la solution de DPPH à laquelle on ajoute 50  $\mu$ l d'une concentration de l'échantillon à tester. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante 25°C pendant 30 min d'incubation.

Pour chaque concentration, le test est réalisé en 3 répétitions successives.

Pour chaque série on prépare un blanc constitué de 2 ml de la solution de DPPH additionné de 50  $\mu$ l de méthanol.

Quelque soit le témoin positif utilisé, sa préparation et son expérimentation sont identiques a celles des autres échantillons (huile essentielle ou extrait méthanolique).

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm par un spectrophotomètre.

##### \* Expression des résultats

L'activité antioxydante est donnée par le pourcentage de l'inhibition des radicaux libres de DPPH (A%) et a été calculé par :

$$A\% = [(A_0 - A_t) / A_0] 100 = [1 - A_t / A_0] 100$$

Avec:  $A_0$ : L'absorbance du blanc ou témoin.

$A_t$ : L'absorbance de l'échantillon.

On peut déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux appelée IC50 ou EC50. Cette grandeur est déterminée en traçant pour un échantillon donné la courbe A% en fonction de la concentration puis on détermine la concentration qui correspond à A% = 50.

\* Etude statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne avec  $\pm$  l'écart type (n=3) pour chaque analyse.

2.2.4. Etude de l'activité antimicrobienne de *Melissa officinalis*

a- Principe

Dans cette partie nous aborderons l'étude de l'effet antimicrobien de la plante, en testant l'effet de son HE, de l'hydrolat, de l'extrait méthanolique et celui de l'infusion. Ils sont comparés aux témoins, en l'occurrence, les antibiotiques et un antifongique.

L'aromatogramme est une technique microbiologique récente qui permet d'étudier, comme un antibiogramme, la sensibilité des germes à l'HE. Elle permet d'évaluer le pouvoir antibactérien et antifongique des HE [50].

Le principe de cette étude consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact des principes et extraits de la plante, par la méthode de diffusion sur gélose.

b- Mode opératoire

\* Les souches testées

Les souches microbiennes testées ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines, et sont des lots de l'ATCC (American

Type Culture Collection) référenciées par le laboratoire de stérilité du Complexe Antibiotical - SAIDAL. (Tableau 2.2)

Tableau 2.2: Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Souches microbiennes	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1803
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

\* Les milieux de culture et extraits végétaux testés

Les milieux utilisés sont la gélose nutritive et la gélose Mueller Hinton pour les bactéries et la gélose Sabouraud pour la levure.

Ces milieux ont été préalablement coulés d'une manière aseptique dans des boîtes de Pétri.

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des extraits végétaux suivants: HE, HA, l'extrait méthanolique dilué dans quelques ml d'éthanol (avec un test préliminaire de l'éthanol) et des infusions à 10% et à 30%.

\* Préparation des précultures

La suspension de chaque souche a été préparée séparément en prélevant, à l'aide d'une anse stérile, 2 à 3 boucles de culture jeune de 18 à 24 h fraîchement réactivée. Les microorganismes sont déposés dans un tube de solution physiologique stérile. L'ensemble est agité énergiquement.

La densité optique de chaque suspension doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde de 625 nm, ce qui correspond environ à une centaine de millions de germes par ml.

\* Les techniques microbiologiques:

✓ Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongique

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il en est de même pour l'antifongogramme.

La sensibilité a été testée par la méthode de diffusion ou antibiogramme standard, vis-à-vis de deux antibiotiques à savoir: la pénicilline et la gentamicine ainsi qu'un antifongique "Amphotéricine B " pour la levure.

✓ Test par diffusion sur gélose du pouvoir antimicrobien de l'HE, hydrolat, extrait méthanolique et infusés

Des disques en papier absorbant de 9 mm de diamètre ont été imprégnés d'une faible quantité de chaque échantillon, puis déposés à la surface du milieu de cultureensemencé par la suspension microbienne.

Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 3 à 5 jours pour la levure.

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre (Figure 2.9).

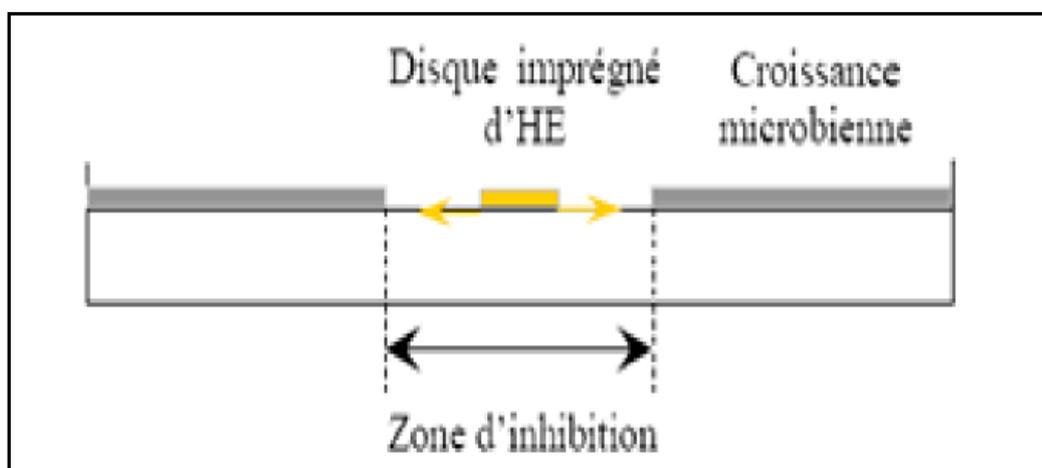


Figure 2.9: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatochromogrammes [75].

\* Expression des résultats

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

Tableau 2.3: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés.

Diamètres de la zone d'inhibition	Transcription	Sensibilité du germe
0	0	Résistant
5 mm	±	Peu sensible
10 mm	+	Sensible
20 à 30 mm	++	Assez sensible
> 30 mm	+++	Très sensible

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Résultats de l'étude botanique de la plante

##### 3.1.1. Etude macroscopique

Après identification de la plante récoltée dans la région de Hammam Melouane, nous avons eu recours à quelques observations macroscopiques et microscopiques.

##### 3.1.1.1. La tige

Elle est quadrangulaire et mesure 60 à 80 cm de longueur. Elle est tapissée à loupe binoculaire, de poils épidermiques (Figure 3.1).

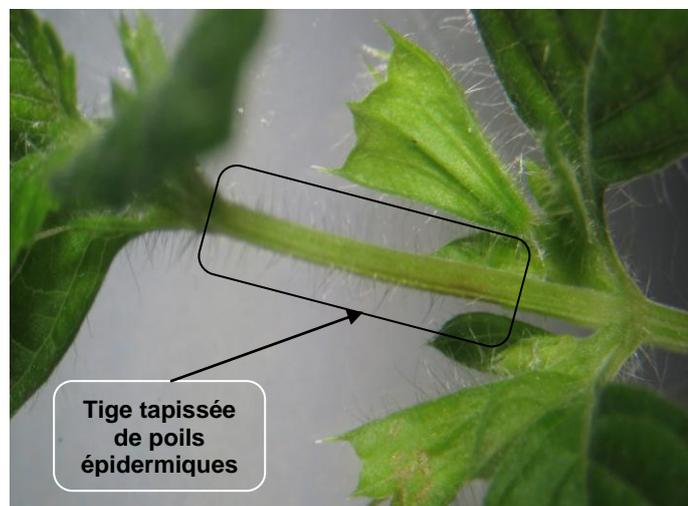


Figure 3.1: Vue d'une partie de la tige à la loupe Gx 2.5 (originale)

##### 3.1.1.2. La feuille

L'observation d'une feuille à la loupe binoculaire révèle que le limbe est ridé. Il est de couleur vert foncé sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure. La feuille est tapissée de poils épidermiques qui recouvrent les deux faces (Figure 3.2, a,b,c et d).

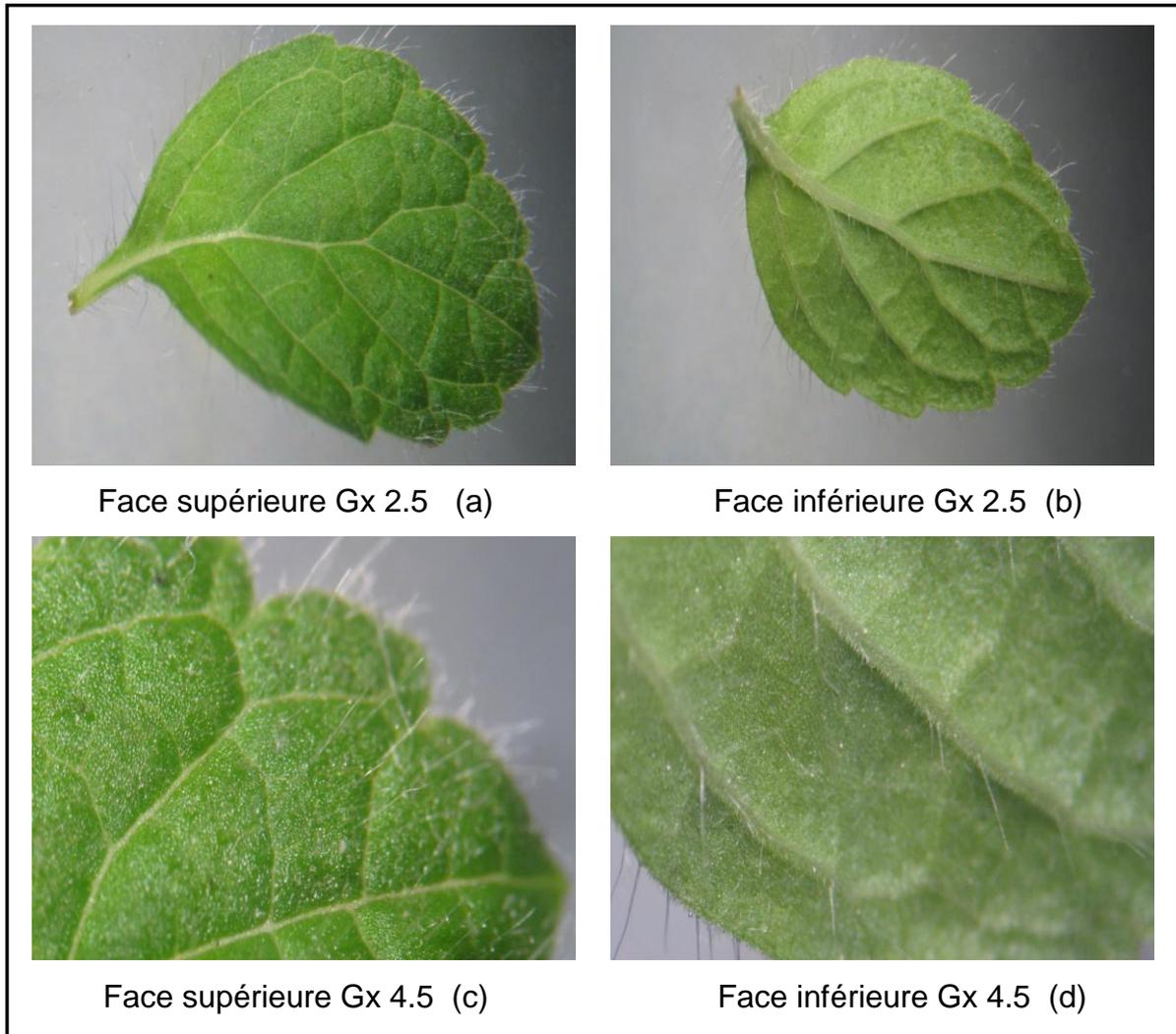


Figure 3.2: Vue d'une feuille (faces supérieure et inférieure) à la loupe binoculaire (originale)

### 3.1.1.3. La fleur

Elle est petite, de quelques mm de taille. Elle est de couleur jaunâtre au stade bouton, puis blanche après l'épanouissement. Elle présente un tube et un limbe à deux lèvres inégales (Figure 3.3).

Les étamines sont au nombre de 4. L'ovaire est supère et comprend 2 loges renfermant chacune 2 ovules (Figures 3.4 et 3.5).

Après maturation, le fruit contient 4 graines luisantes de couleur brunâtre à noir. La graine montre une écorce dure couverte d'un film argenté sur la face intérieure (Figures 3.6).

A la loupe binoculaire, la fleur présente des poils épidermiques au niveau du calice et de la corolle (Figures 3.3, 3.4 et 3.5).

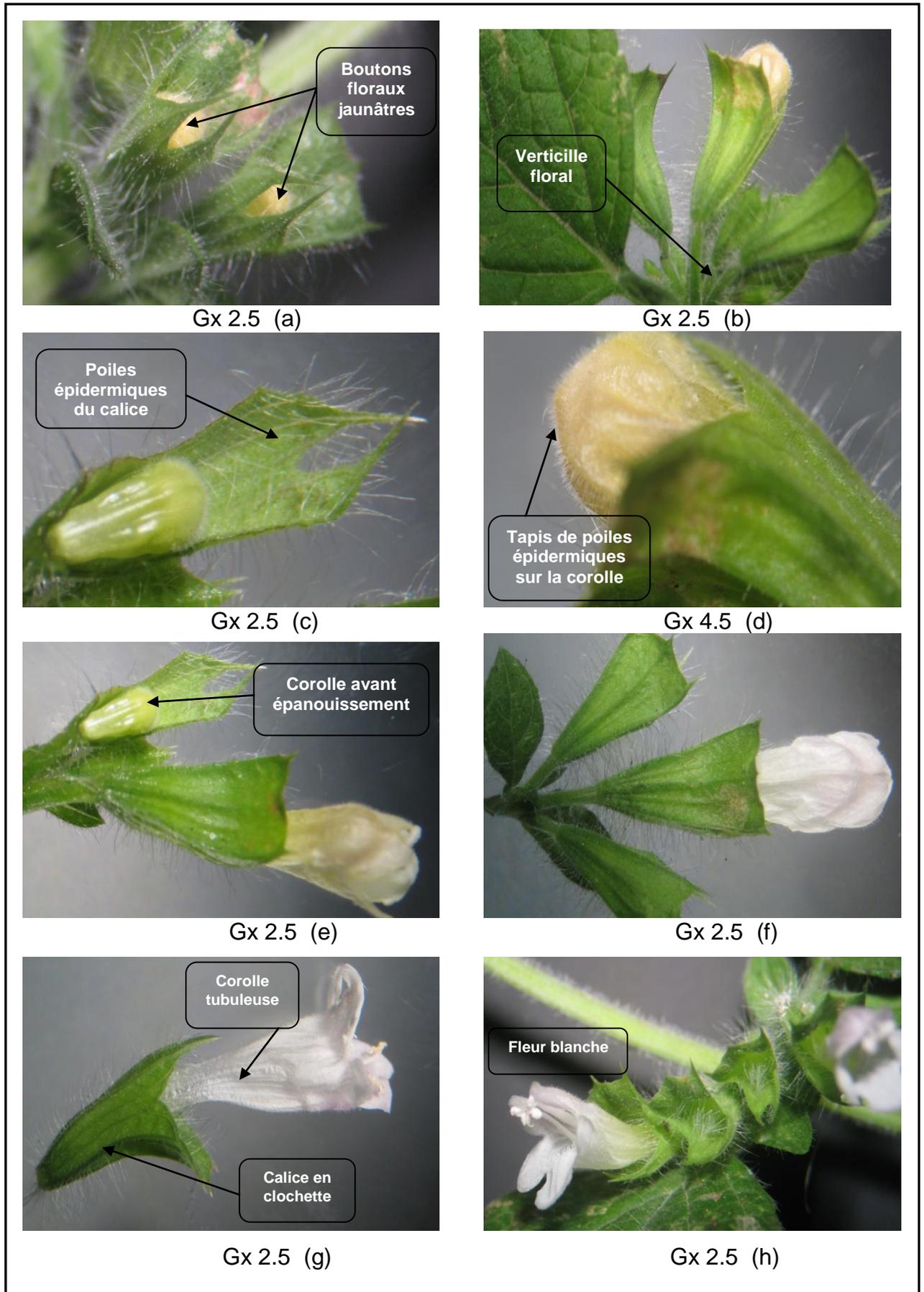


Figure 3.3: Vue de la fleur à la loupe binoculaire (originale)

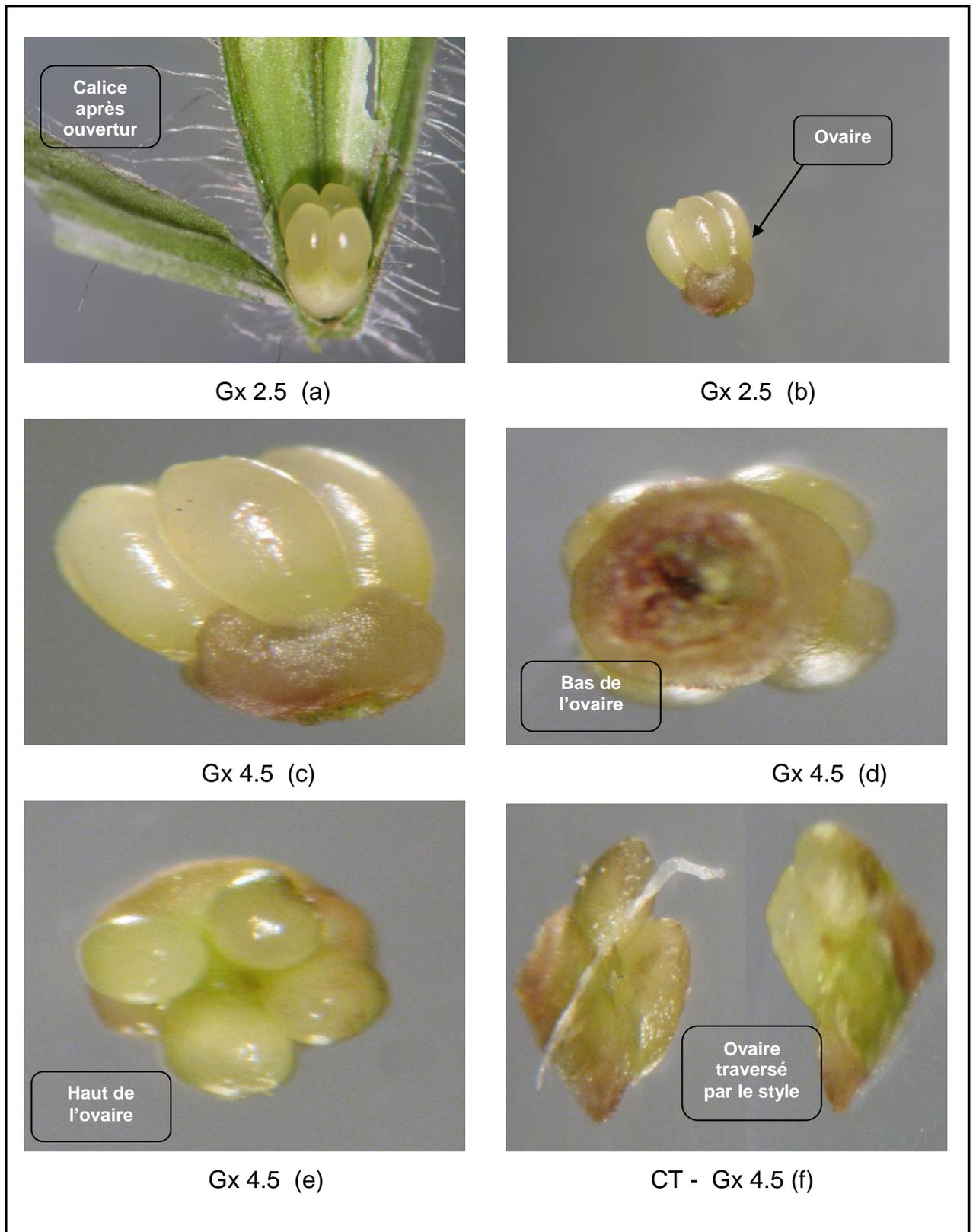


Figure 3.4: Vue de l'ovaire à la loupe binoculaire (originale)

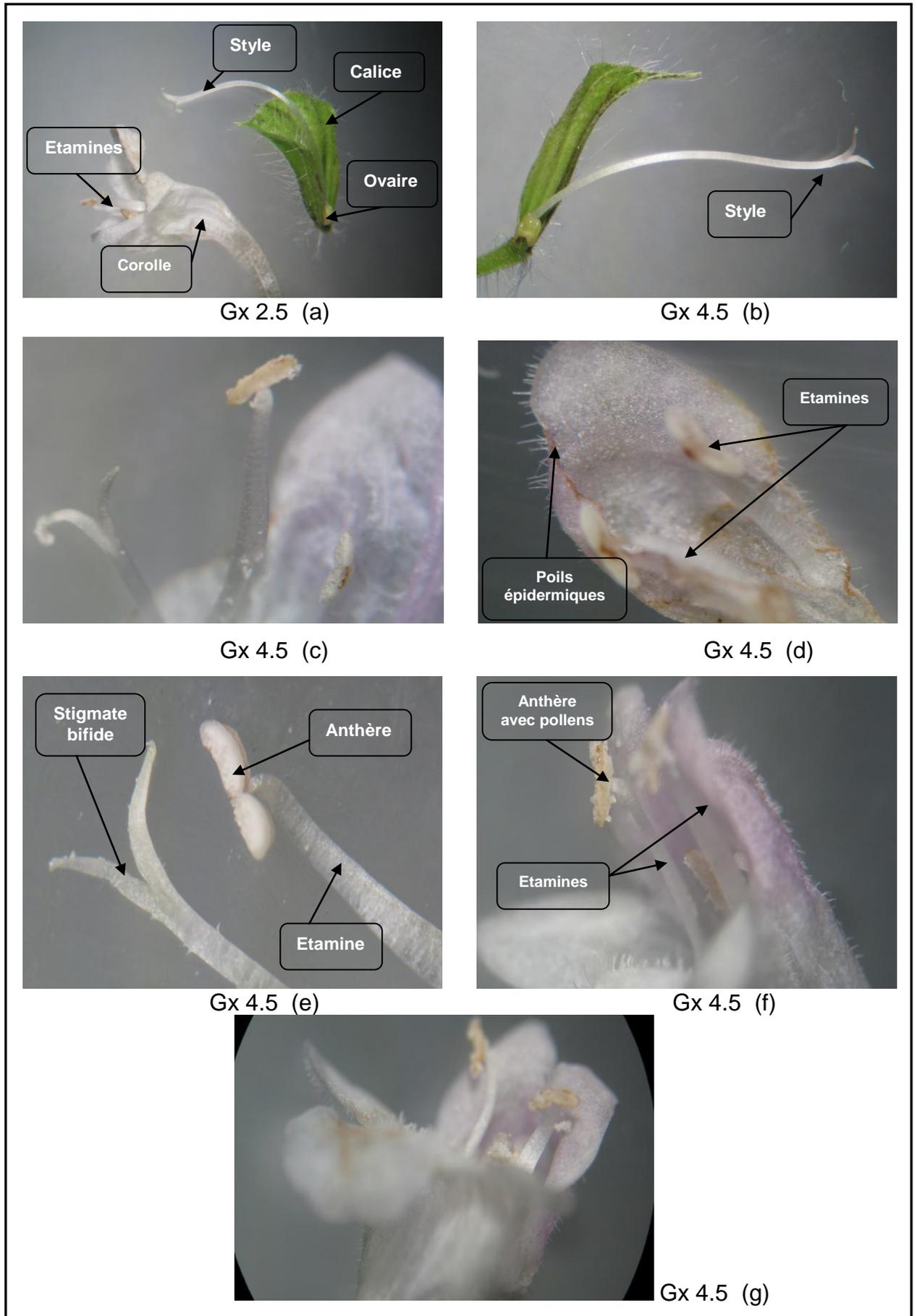


Figure 3.5: Vue de la fleur (étamines) à la loupe binoculaire (originale)

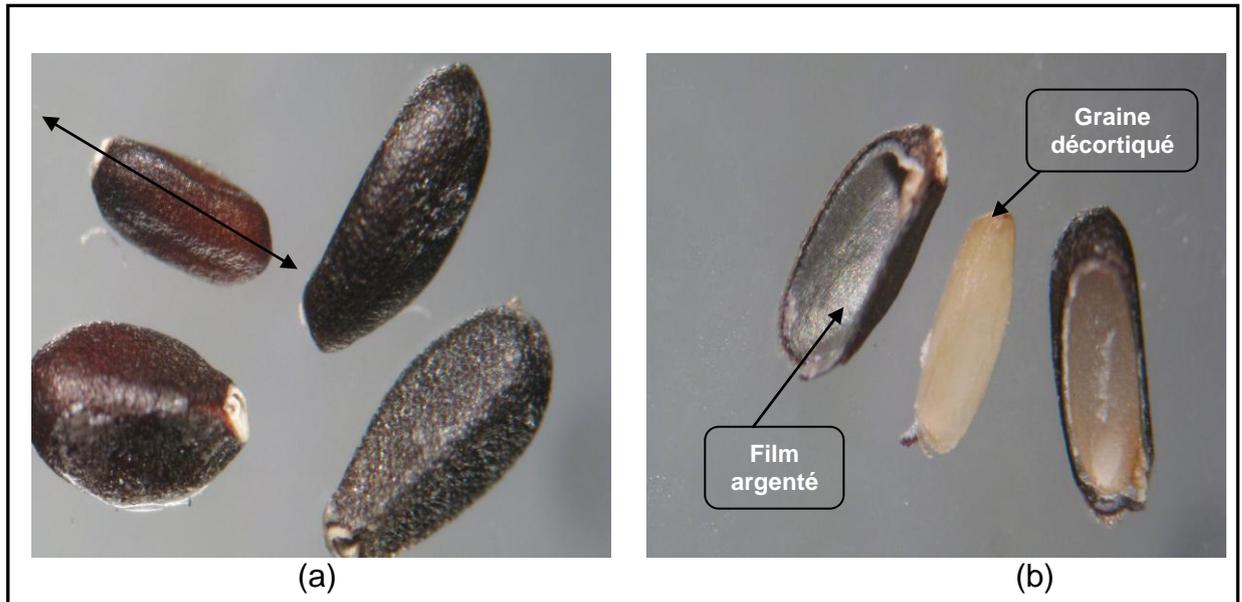


Figure 3.6: Vue des graines à la loupe binoculaire Gx 4.5 (originale).

### 3.1.2. Etude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices, nous avons effectué des coupes histologiques minces et colorées dans les tiges, les feuilles ainsi que le pétiole.

#### 3.1.2.1. La tige

Dans la coupe transversale de la tige (figures 3.7, 3.8, 3.9 et 3.10), on observe de l'extérieur vers l'intérieur :

- ✓ Une cuticule
- ✓ Le collenchyme angulaire
- ✓ Le parenchyme cortical
- ✓ Le liber
- ✓ Le bois
- ✓ La moelle ou parenchyme médullaire.

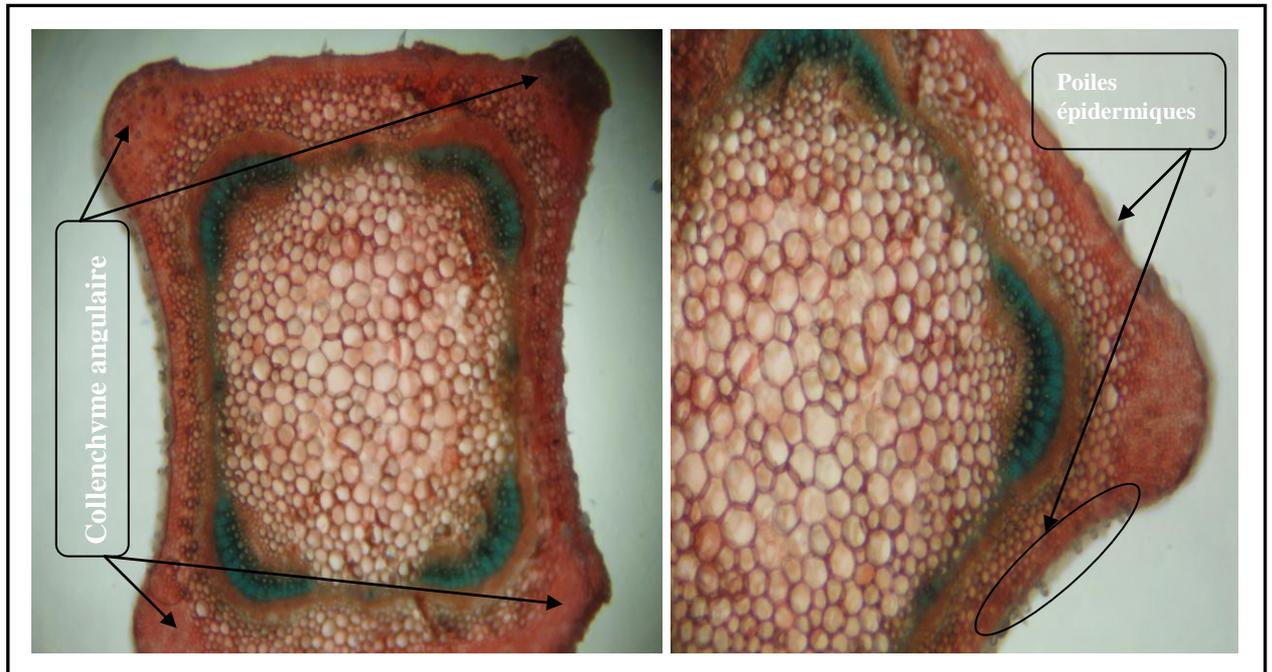


Figure 3.7: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 10 (originale)

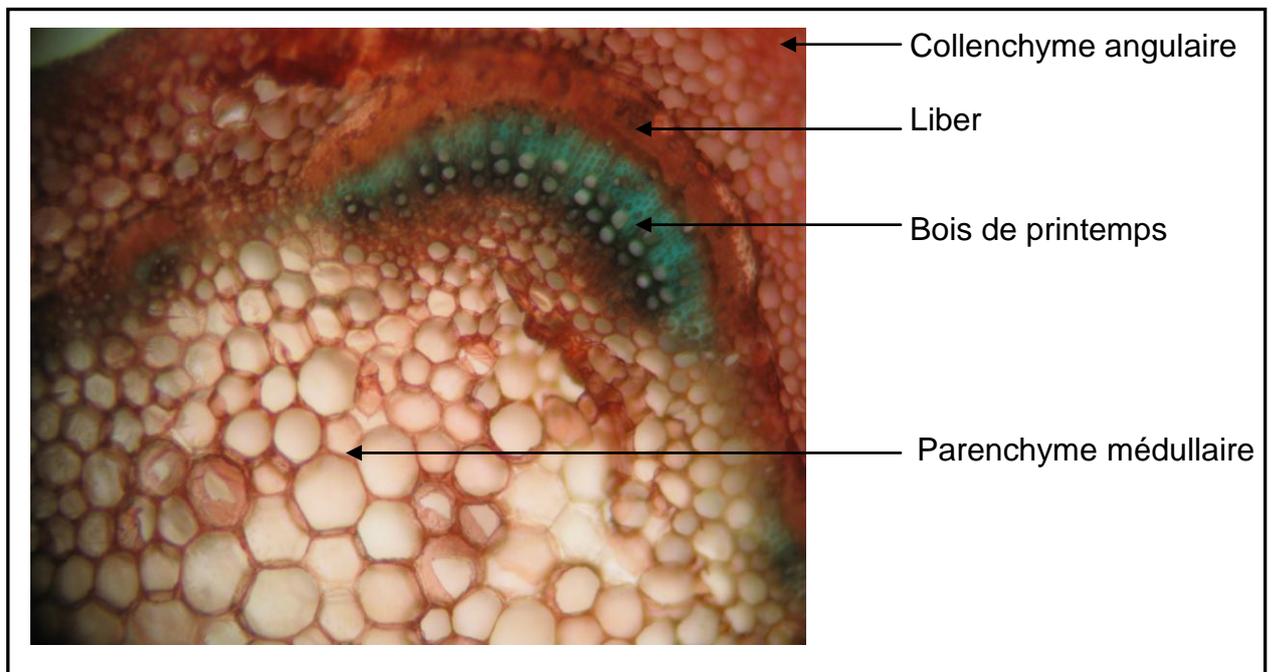


Figure 3.8: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40 (originale)

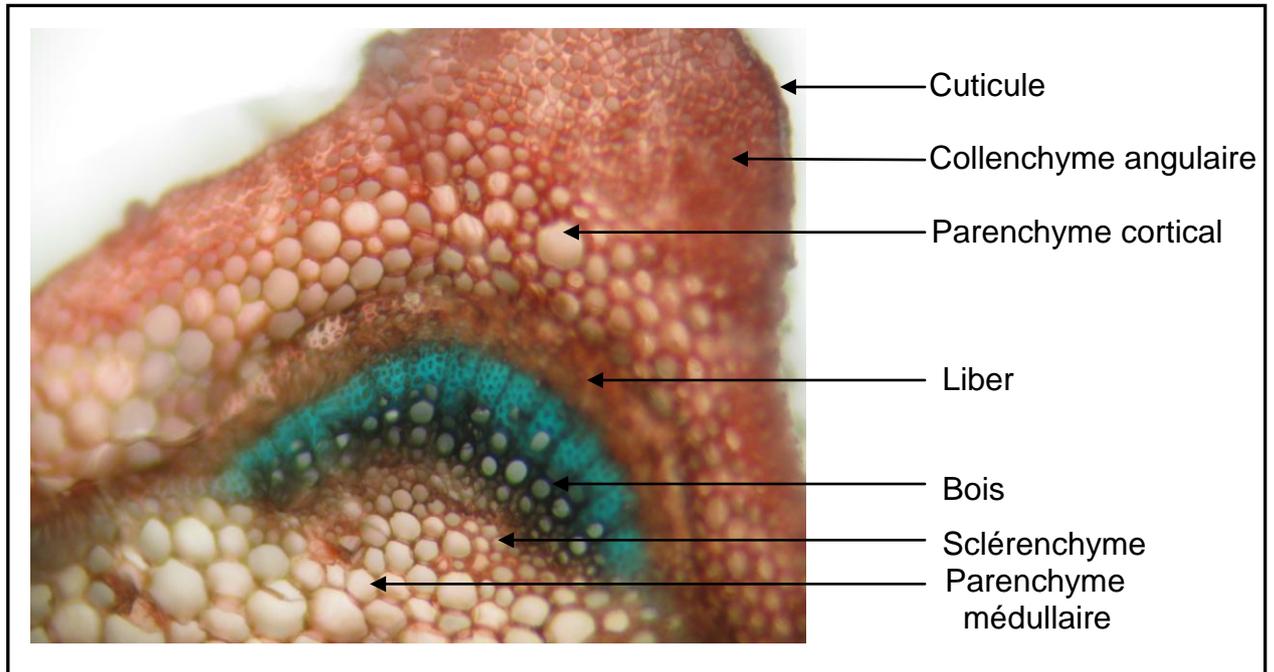


Figure 3.9: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40 (originale)

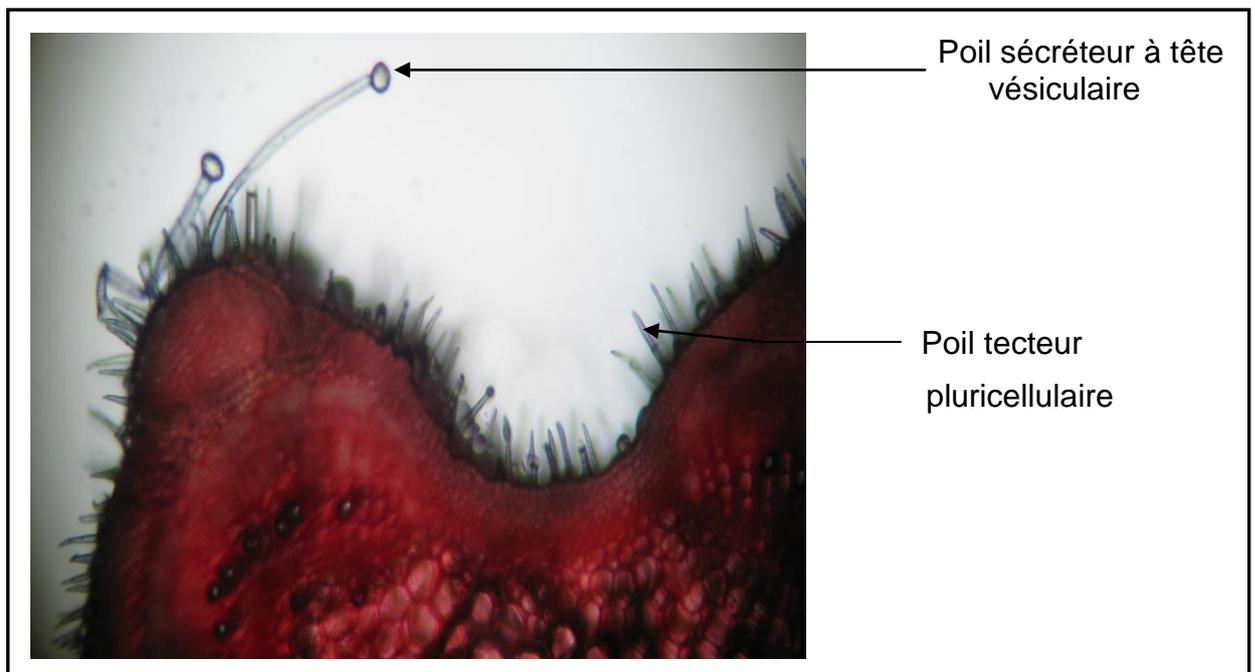


Figure 3.10: Observation microscopique des poils au niveau de la tige Gx 40 (originale)

### 3.1.2.2. La feuille

Les feuilles sont tapissées de poils épidermiques. Leur observation au microscope photonique précise leur structure pluricellulaire (Figures 3.11 et 3.12).

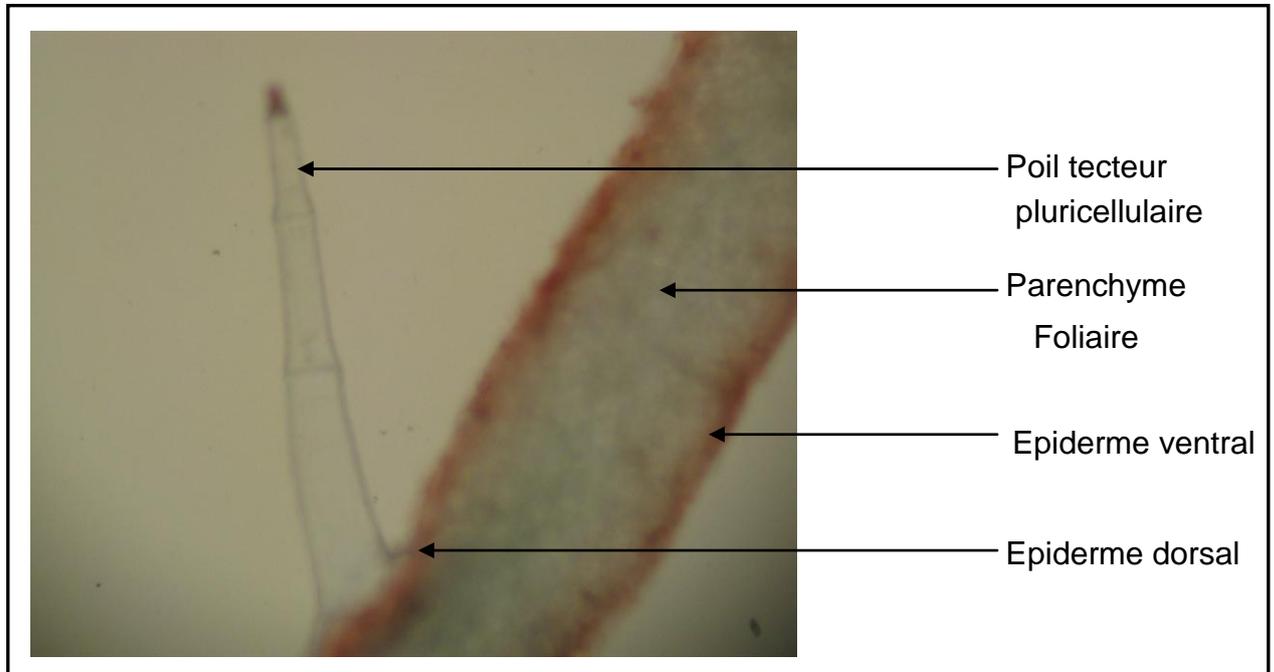


Figure 3.11: Coupe transversale au niveau de la feuille Gx 10 (originale)

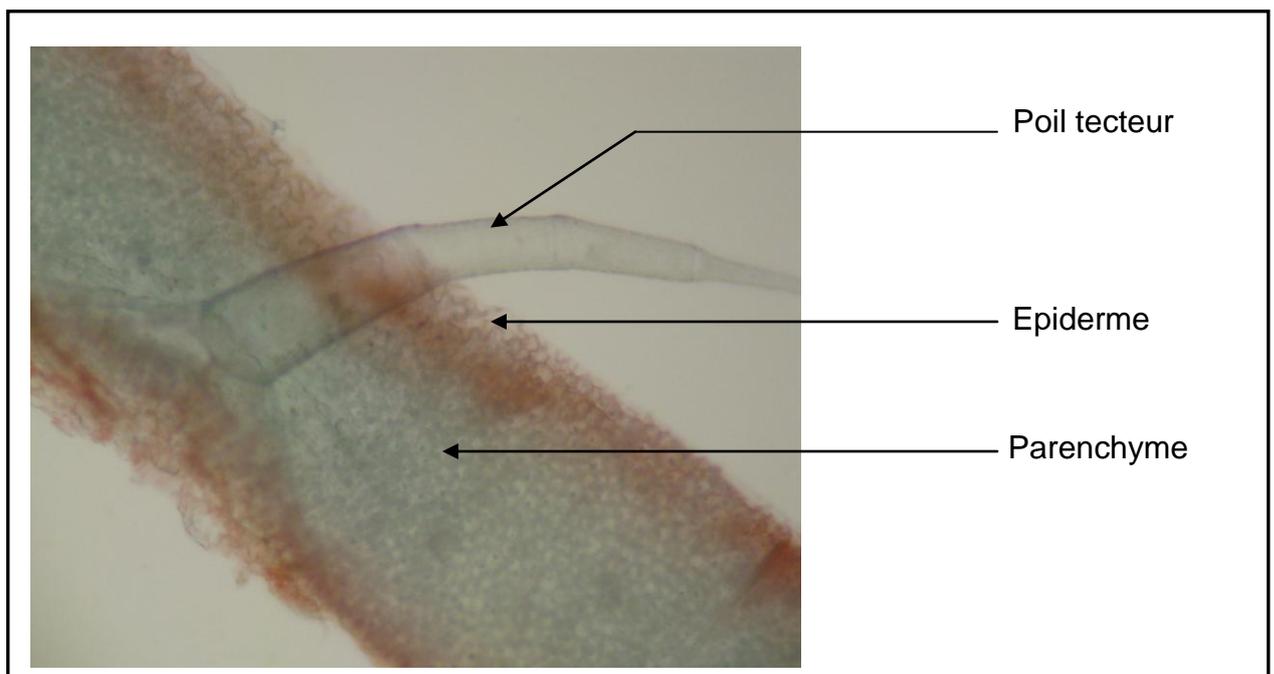


Figure 3.12: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40 (originale)

### 3.1.2.3. Le pétiole

En coupe transversale (Figures 3.13 et 3.14) de l'extérieur vers l'intérieur, le pétiole montre les structures anatomiques suivantes

- ✓ La cuticule tapissée de poils pluricellulaires (Figure 3.15).
- ✓ Le collenchyme
- ✓ Les structures secondaires qui impliquent les nervures et qui représentent le bois et le liber

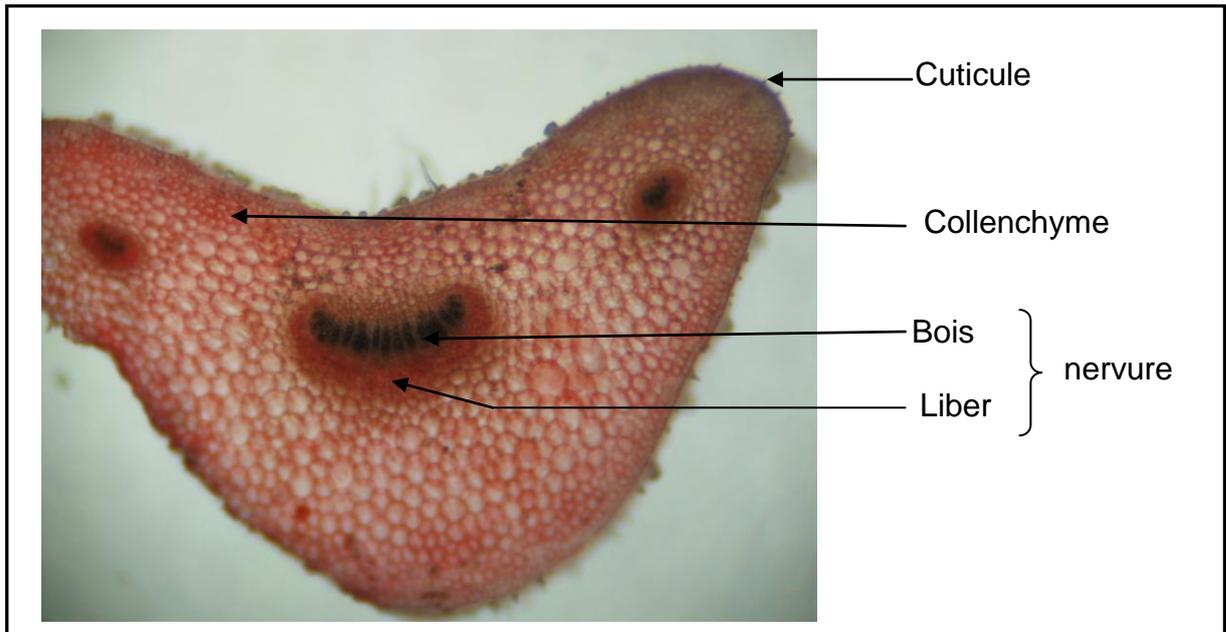


Figure 3.13: Coupe transversale au niveau du pétiole Gx 10 (originale)

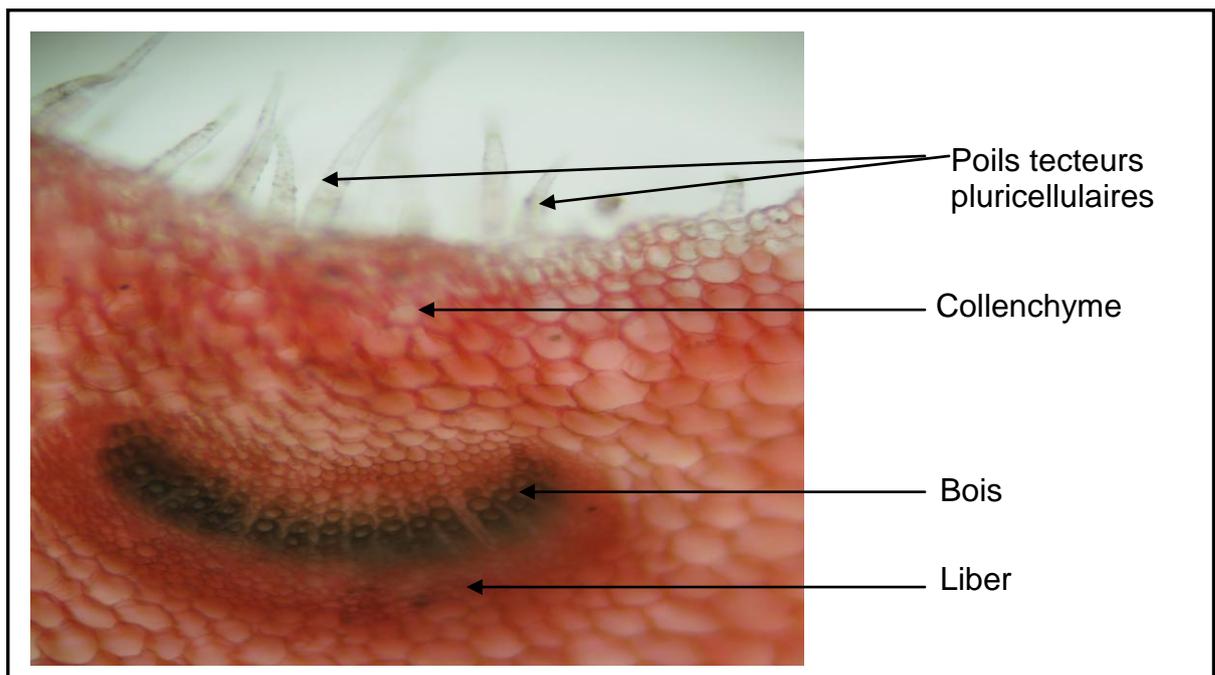


Figure 3.14: Coupe transversale au niveau du pétiole Gx 40 (originale)

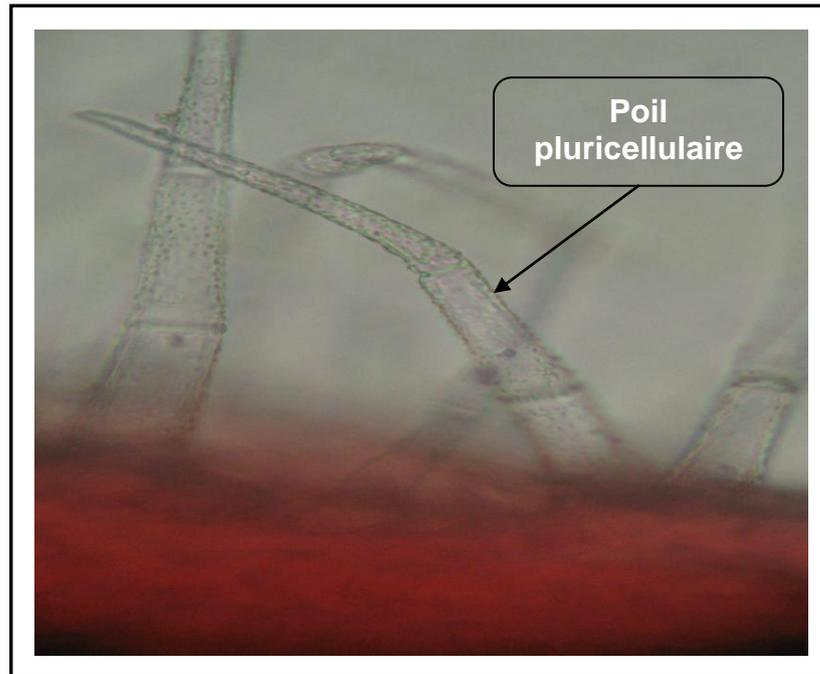


Figure 3.15: Observation microscopique des poils au niveau du pétiole Gx 40 (originale)

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

Les coupes histologiques réalisées dans les organes étudiés montrent l'absence de cellules sécrétrices, de poches sécrétrices ou de canaux excréteurs.

Les poils épidermiques à tête vésiculaire sont responsables de la sécrétion de l'HE.

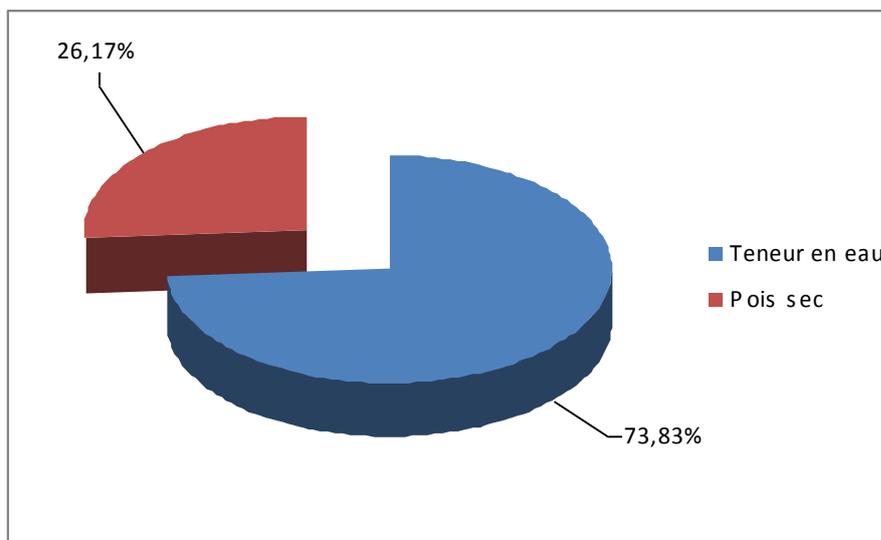
### 3.2. Résultats de l'étude phytochimique de *Melissa officinalis* L.

#### 3.2.1. Détermination de la teneur en eau

Le résultat de la teneur en eau de la mélisse est présenté dans le tableau 3.1 (détail en Appendice D)

Tableau 3.1: Résultats de la teneur en eau

Poids frais (moyenne en g $\pm$ écart type)	Poids sec (moyenne en g $\pm$ écart type)	Teneur en eau (% de poids frais $\pm$ écart type)
100,5990 $\pm$ 2,4067	26,2835 $\pm$ 1,3511	73,8272 $\pm$ 1,9516

Figure 3.16: Teneur en eau de *Melissa officinalis* L.

Nous constatons suivant la figure 3.16, que *Melissa officinalis* est très riche en eau. La teneur est 73,83 %. Ainsi, les 3/4 du poids de la plante représentent l'eau.

### 3.2.2. Détermination de la teneur en cendres

Après une calcination totale de la poudre de mélisse, la teneur en cendre est calculée (tableau 3.1, détail en Appendice D)

Tableau 3.2: Résultats de la teneur en cendres

Prisse d'essai (moyenne en g $\pm$ écart type)	Poids après calcination totale (moyenne en g $\pm$ écart type)	Teneur en cendres (% du poids sec $\pm$ écart type)
1,0066 $\pm$ 0,0046	0,1119 $\pm$ 0,0006	11,1133 $\pm$ 0,0212

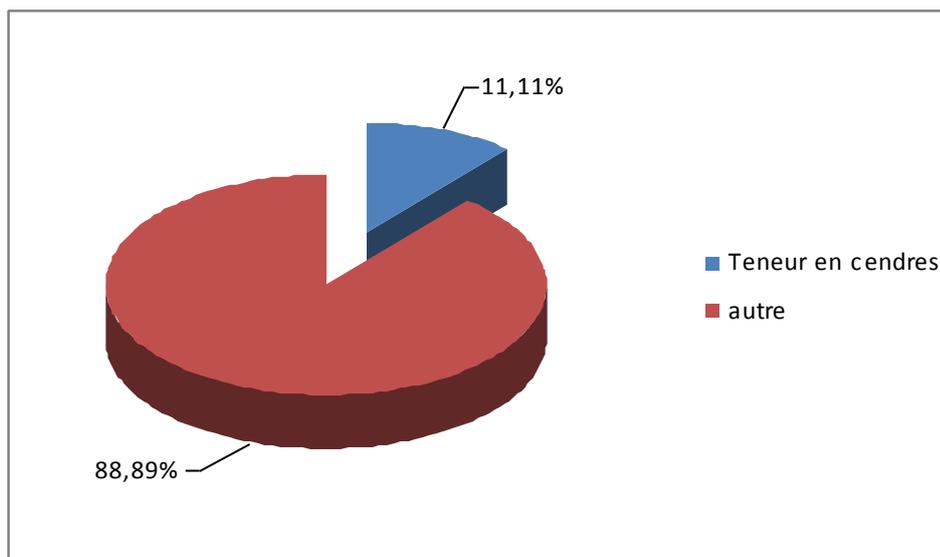


Figure 3.17: Teneur en cendres de *Melissa officinalis* L.

La figure 3.17 montre que *Melissa officinalis* présente une teneur de 11 % en cendre. Cette valeur est conforme aux normes déterminées par la pharmacopée Européenne (2005) qui prévoit des valeurs comprises entre 10 et 12 % [61].

### 3.2.3. Etude des principes actifs de *Melissa officinalis* L

#### 3.2.3.1. Etude des composés volatils.

##### 3.2.3.1.1. Extraction et rendement en huile essentielle.

L'huile essentielle extraite à partir des organes aériens de la plante séchée à été obtenue par le procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Le tableau 3.3 (détail en Appendice D) montre le rendement en HE de mélisse.

Tableau 3.3: Résultats du rendement

Poids de la plante (moyenne en g ± écart type)	Poids de l'HE (moyenne en g ± écart type)	Rendement (% ± écart type)
792,8259 ± 75,9605	1,3780 ± 0,0767	0,1747 ± 0,0126

Le rendement moyen en HE est de 0,17 %. Ce rendement peut varier d'une part, d'une région à une autre, selon les facteurs pédoclimatiques, et d'autre part selon l'équipement d'extraction.

Ce procédé nous a permis d'obtenir une HE dont les caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur) sont consignés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4: Caractéristiques organoleptiques de l'HE

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

Les caractères organoleptiques de *Melissa officinalis* sont très appréciés en parfumerie.

#### 3.2.3.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle

L'analyse de l'HE de *Melissa officinalis* par CG-MS, nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la figure 3.18.

LABORATOIRE CENTRAL DE POLICE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE  
ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE GC/MS

11-FCO-2010 +

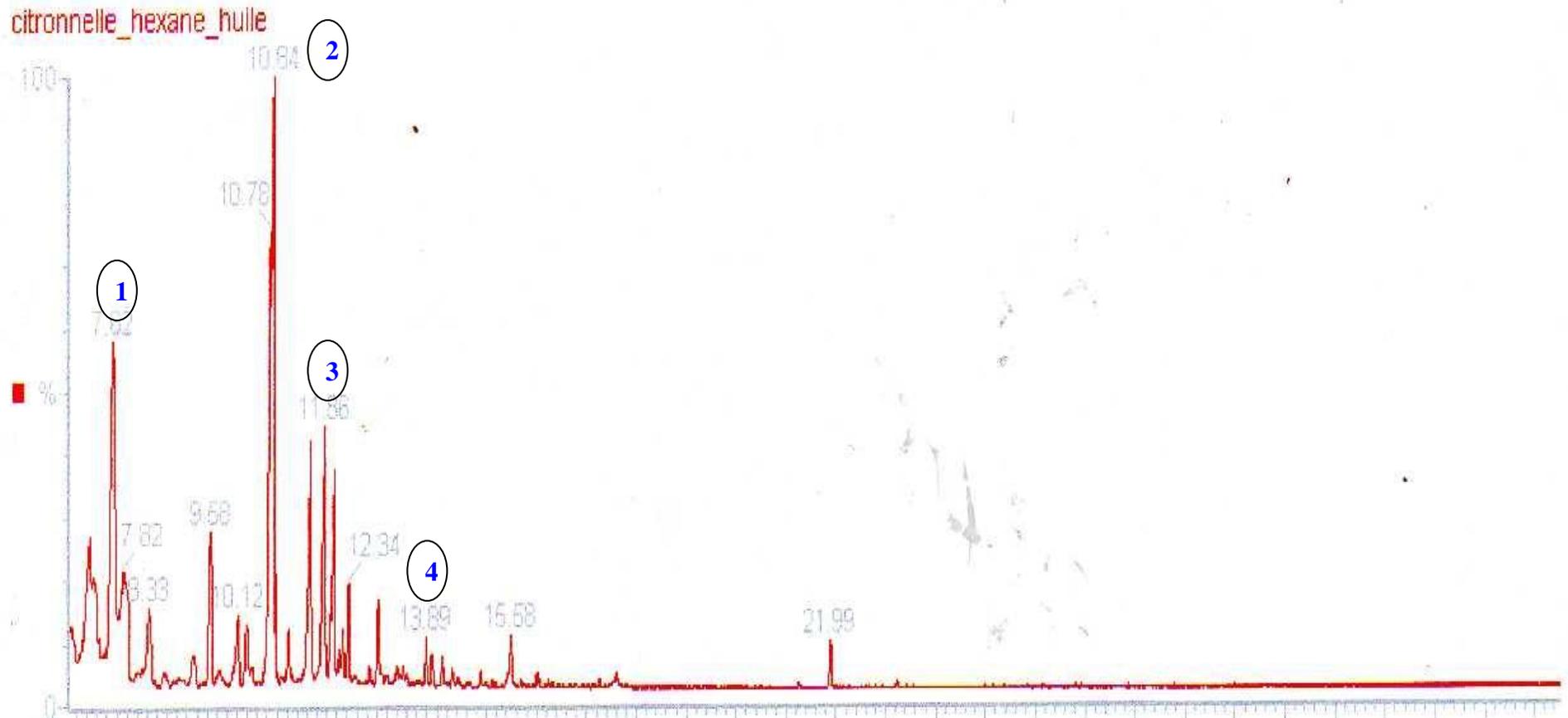


Figure 3.18: Chromatogramme de la fraction volatile de *Melissa officinalis* L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG-MS

❖ Interprétation du chromatogramme:

Le chromatogramme issu de l'analyse de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. comporte quatre pics nécessaires (Figure 3.18). Chaque pic a été soumis à une analyse par spectrophotométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

Le pic n°1 correspond au spectre de masse du néral ou citral b (Figure 3.19) qui est le terpène responsable de l'odeur de la mélisse.

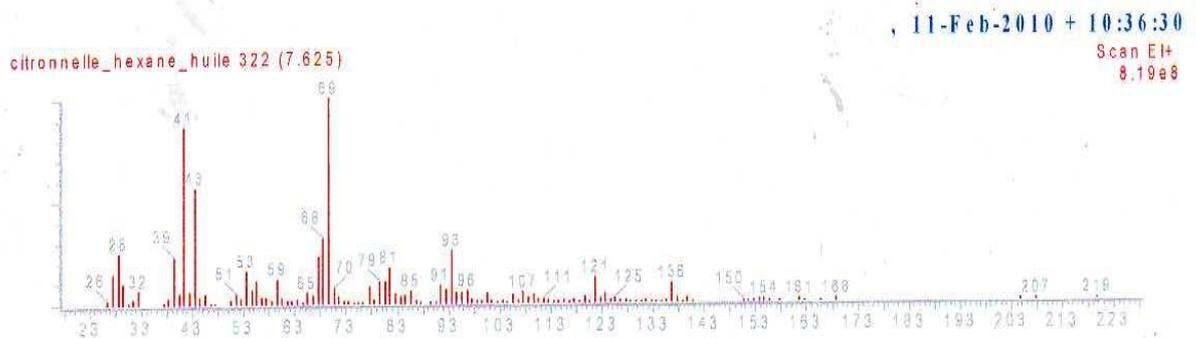


Figure 3.19: Spectre de masse du néral (Citral b)

Le pic n°2, le plus important, correspond au spectre de masse de (-)-oxyde de caryophyllene (Figure 3.20) appartenant à la famille des oxydes terpéniques. Selon ANTON, R. et WICHTL, M, ce composé est le résultat de la transformation de  $\beta$ -caryophyllene en époxyde de caryophyllene durant la conservation de la plante [10]. C'est un stéréoisomère de l'époxyde de caryophyllene.

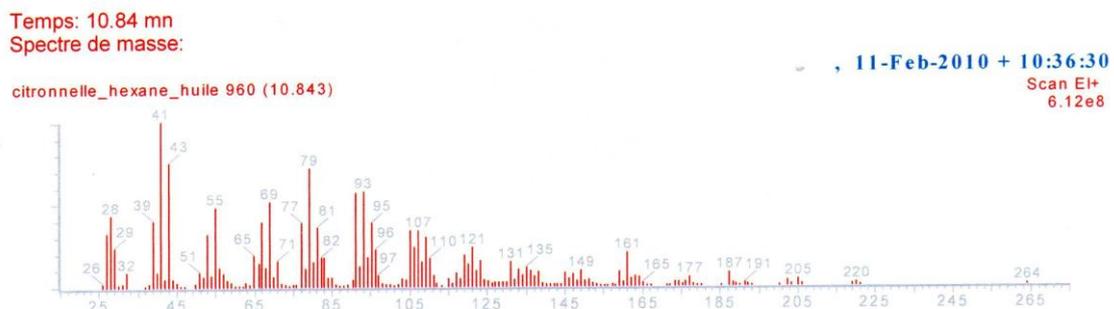


Figure 3.20: Spectre de masse de l'oxyde de caryophyllene

Le pic n°3 correspond au spectre de masse de bergamotene (Figure 3.21) qui appartient à la famille des sesquiterpènes.

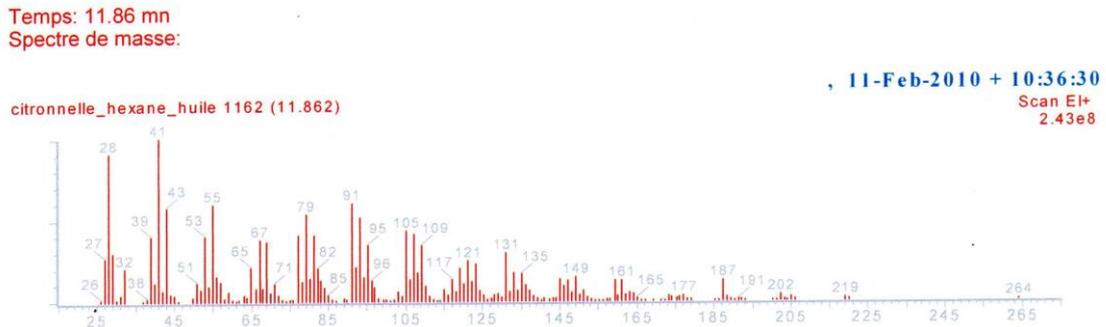


Figure 3.21: Spectre de masse de bergamotene

Le pic n°4 correspond au spectre de masse de l'acétate de citronellyl (Figure 3.22) qui est un ester.

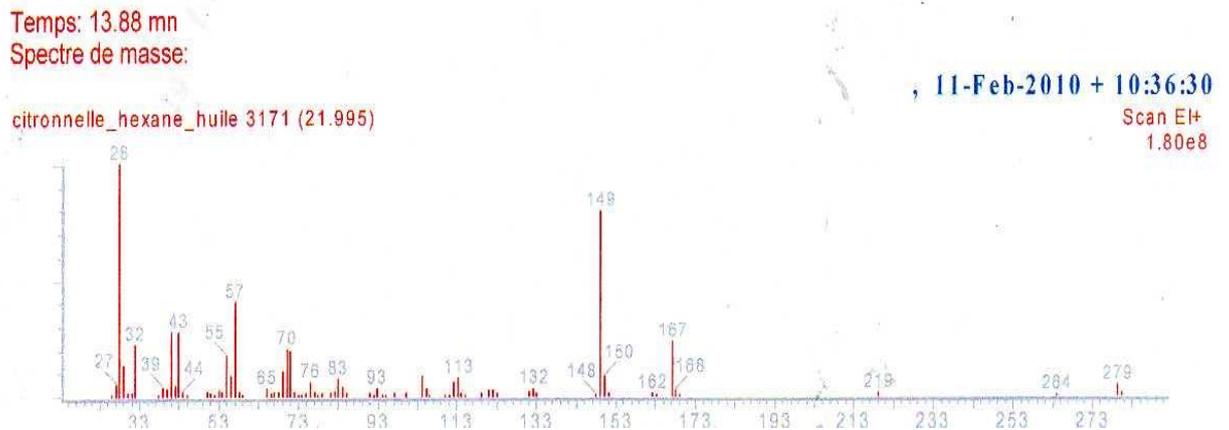
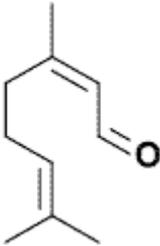
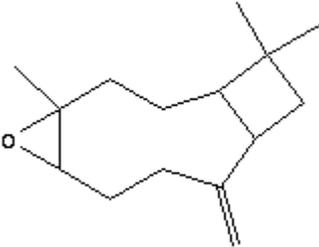
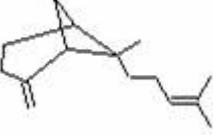
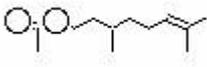


Figure 3.22: Spectre de masse de l'acétate de citronellyl

Le détail de la composition chimique des molécules est représenté dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5: Composition chimique de l'HE de *Melissa officinalis* L.

Temps de rétention (min)	Composés majoritaires	Formule brute	Structure chimique
7,62	Néral (Citral b)	$C_{10}H_{16}O$	
10,84	(-)- oxyde de caryophyllène	$C_{15}H_{24}O$	
11,86	Bergamotène	$C_{15}H_{24}$	
13,88	Citronellyl acétate	$C_{12}H_{22}O_2$	

Ces constituants majoritaires qui caractérisent cette HE peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres notamment les conditions de stockage ainsi que l'équipement et le mode d'extraction.

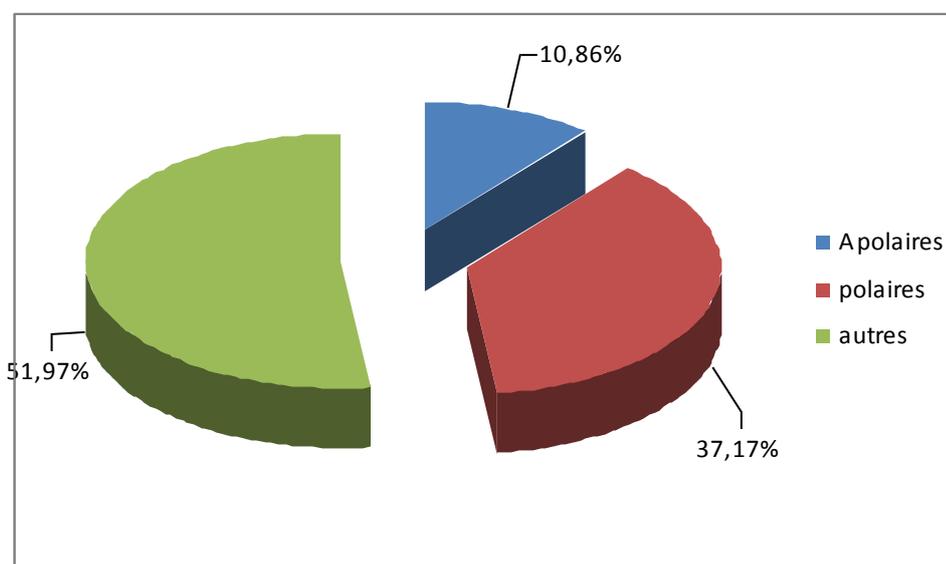
### 3.2.3.2. Étude des composés non volatiles apolaires et polaires

#### 3.2.3.2.1. Résultat de l'extraction au soxhlet

L'extraction à l'aide du soxhlet, des composés apolaires et polaires de la poudre de mélisse a donné les résultats regroupés dans le tableau 3.6 (détail en Appendice D)

Tableau 3.6: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires.

	Poids de la poudre (moyenne en g $\pm$ écart type)	Poids de la concrète (moyenne en g $\pm$ écart type)	Pourcentage (% $\pm$ écart type)
Composés apolaires	40,0100 $\pm$ 0,0031	4,3452 $\pm$ 0,2704	10,8602 $\pm$ 0,6750
Composés polaires		14,8708 $\pm$ 0,6210	37,1675 $\pm$ 1,5493

Figure 3.23: Teneur en composés apolaires et polaires de *Melissa officinalis* L.

La figure 3.23, montre que la teneur en substances non volatiles est de 51,97% du poids de la poudre de la plante. Les composés apolaires représentent 10,86 % et les composés polaires représentent 37,17 % du poids de la poudre de la plante.

#### 3.2.3.2.2. Analyse des fractions par Spectrophotomètre UV-visible

Un balayage a été effectué entre 220 nm et 800 nm afin de vérifier la présence de métabolites. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 3.24 et 3.25.

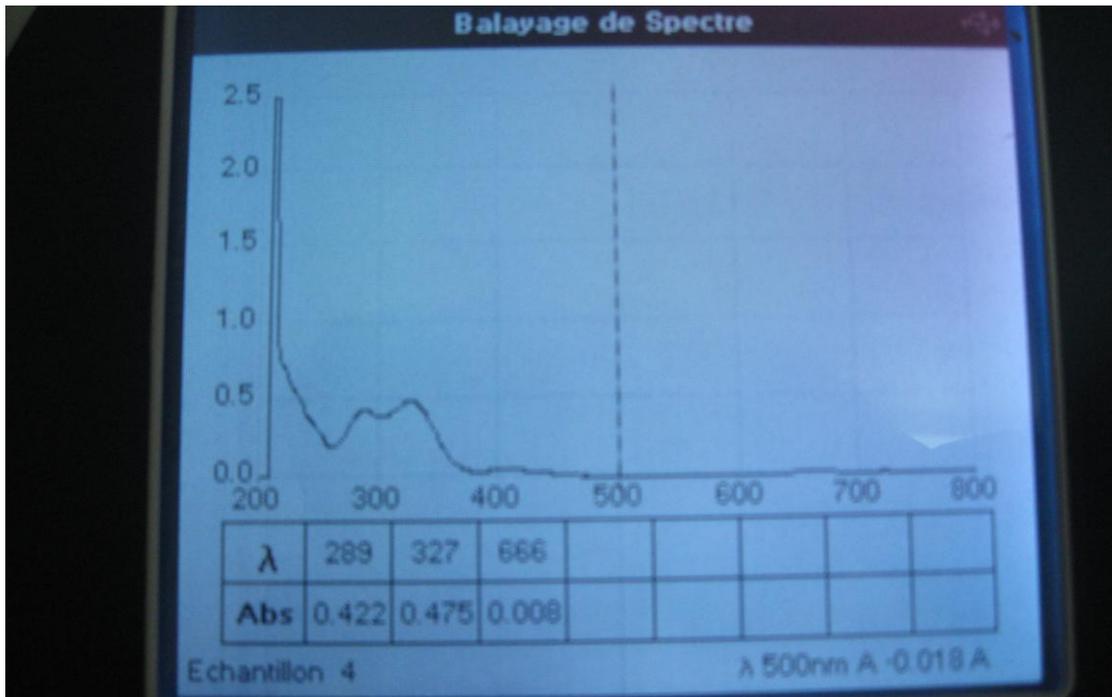


Figure 3.24: Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de *Melissa officinalis* L. (originale)

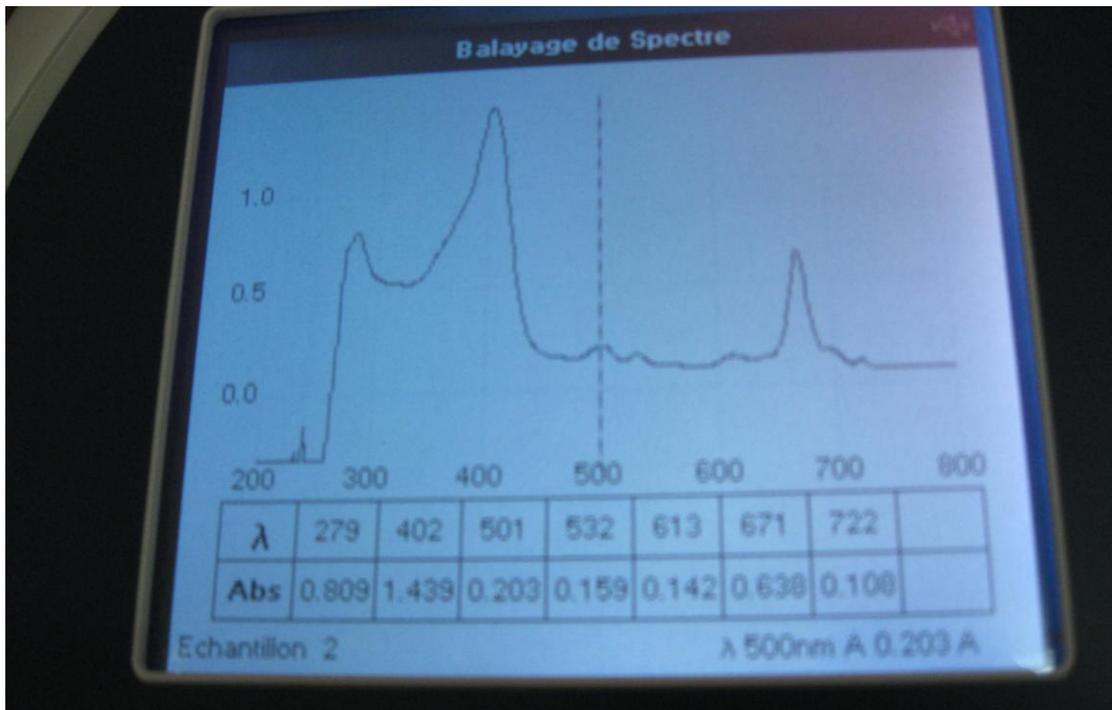


Figure 3.25: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. (originale)

Dans les Figures 3.24 et 3.25 on observe les différents pics d'absorption en fonction de la longueur d'onde et de l'absorbance pour chaque fraction confirmant ainsi l'efficacité de l'extraction.

Selon LAFONT [80], le domaine d'absorption situé entre 291 nm et 300 nm est propre aux composés benzéniques, alors que le domaine entre 400 nm et 498 nm est caractéristique aux caroténoïdes et dérivés. Celui entre 600 nm et 664 nm correspond à la chlorophylle.

✓ La fraction apolaire:

Nous pouvons remarquer la présence de 03 pics à 03 longueurs d'ondes différentes, avec une absorbance élevée entre 250 nm et 350 nm. Cette absorption peut être expliquée par la présence de composés benzéniques.

✓ La fraction polaire:

Nous pouvons remarquer la présence de 07 pics à 07 longueurs d'ondes différentes, ce qui signifie la présence de molécules actives au niveau de cet extrait alcoolique. L'absorption à 402 nm et à 671 nm correspond respectivement à la richesse en caroténoïdes et chlorophylle.

L'analyse des deux concrètes de *Melissa officinalis*, révèle que la fraction polaire est très riche en métabolites secondaires dont un essai de caractérisation a été réalisé par CCM.

#### 3.2.3.2.3. Analyse de la fraction méthanolique par CCM

La CCM a été utilisée d'une manière qualitative pour vérifier la présence ou l'absence des composés actifs majoritaires de *Melissa officinalis*.

Après révélation par méthodes colorimétriques, nous avons confirmé la présence de composés phénoliques: tanins (coloration noirâtre), flavonoïdes (coloration verte brunâtre) et coumarines (tâche jaune verdâtre).

(Résultats illustrés par la figure 1 en Appendice E).

### 3.2.3.3. Extraction de certains principes actifs de *Melissa officinalis* L

#### 3.2.3.3.1. Résultats de l'extraction des tanins

Le résultat de la teneur en tanins obtenue de la poudre de mélisse est présenté dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7: Résultats de la teneur en tanins

Prisse d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Tanins (% / g du poids sec)
30	2,2795	7,5983

Le tableau 3.7. montre que *Melissa officinalis* est très riche en tanins, avec un taux de 7,5983%, donnant à cette plante les différentes propriétés thérapeutiques [54].

Cette teneur correspond principalement à l'acide rosmarinique tel qu'il est précisé par Anton [10] et Teuscher [27].

Le résultat de la CCM, représenté par la figure 2 en Appendice E, montre une tâche de couleur noirâtre compatible à celle de l'extrait méthanolique.

#### 3.2.3.3.2. Résultats de l'extraction des flavonoïdes

Le tableau 3.8 montre le résultat de la teneur en flavonoïdes de la poudre de mélisse.

Tableau 3.8: Résultats de la teneur en flavonoïdes

Prisse d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Flavonoïdes (% / g du poids sec)
30	0,1908	0,6360

Nous constatons d'après ce résultat que *Melissa officinalis* contient 0,6360% de flavonoïdes.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Teuscher [27]. En effet, selon Teuscher [27], la teneur en flavonoïdes est comprise entre 0,2 % et 0,7 % chez la mélisse.

Le résultat de la CCM, représenté par la figure 3 en Appendice E, montre une tâche de couleur brunâtre compatible à celle de l'extrait méthanolique.

### 3.3. Résultats du test du pouvoir antioxydant de *Melissa officinalis* L.

En raison de l'implication des radicaux libre dans diverses pathologies, les recherches de nouvelles molécules pouvant palliées au déficit du système de défense endogène se sont largement intensifiées [76].

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour les extraits étudiés, nous avons utilisé la méthode au DPPH\*. Ce radical libre présente une coloration violet sombre lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature et la concentration de la substance antiradicalaire (Appendice F).

Cette méthode est considérée comme étant très rapide, simple à mettre en œuvre, très sensible, très reproductible, ne nécessitant pas de matériels spécifiques.

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH sont présentés en détail dans les tableaux 1, 2, 3 et 4 en Appendice F.

#### 3.3.1. Résultats de l'absorbance du DPPH

Mesurée à 517 nm, l'absorbance du DPPH dans les témoins positifs qui sont l'acide gallique (produit synthétique) et le tocophérol (vitamine E), chute rapidement dans un intervalle très réduit. La même réponse est obtenue avec l'extrait méthanolique de *M.officinalis* (Figures 3.26 et 3.27).

Concernant l'HE de la Mélisse, la chute de l'absorbance est certes observée mais, elle est moins accentuée.

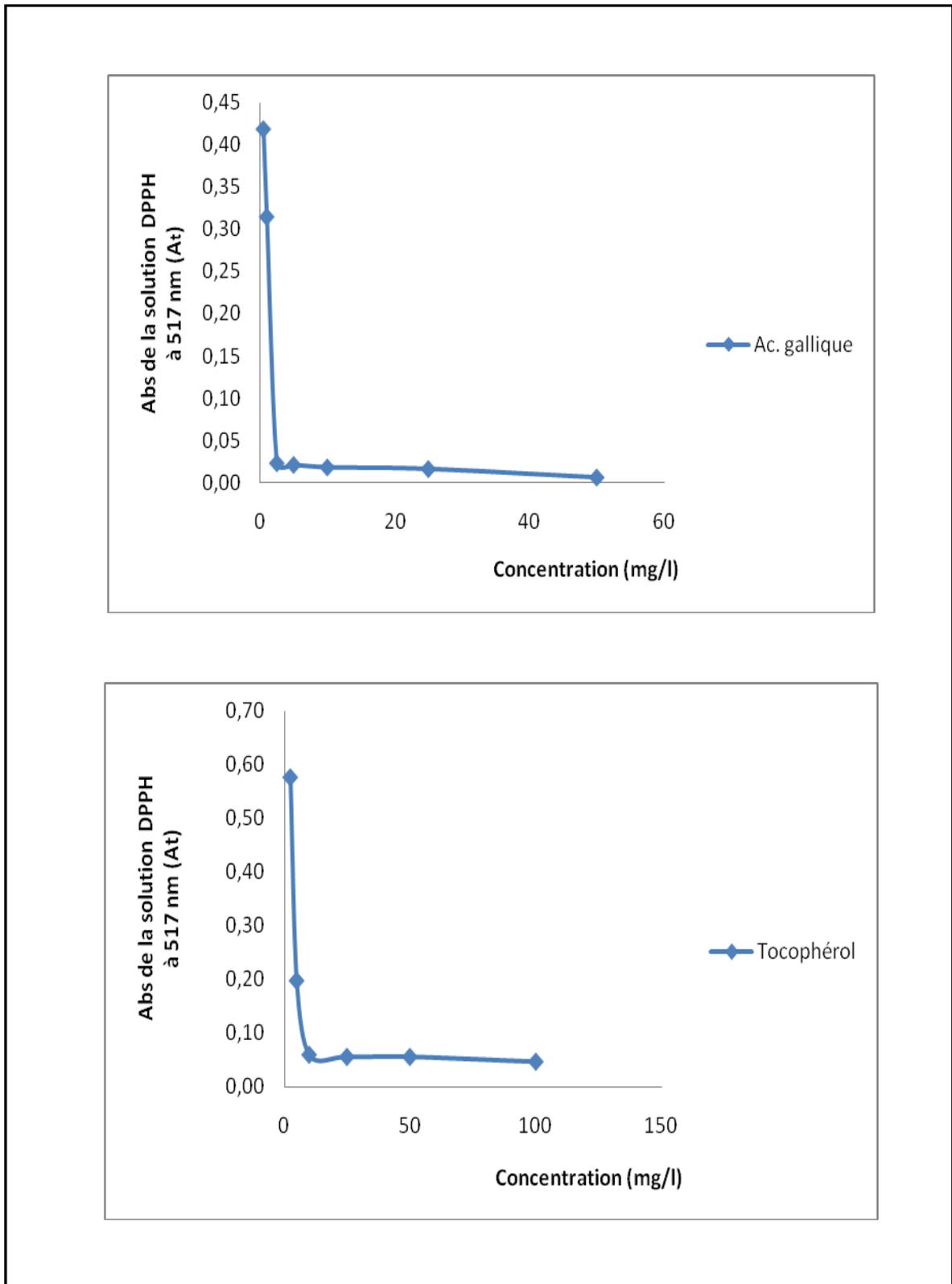


Figure 3.26: Evolution de l'absorbance des solutions de témoins testés en fonction de différentes concentrations.

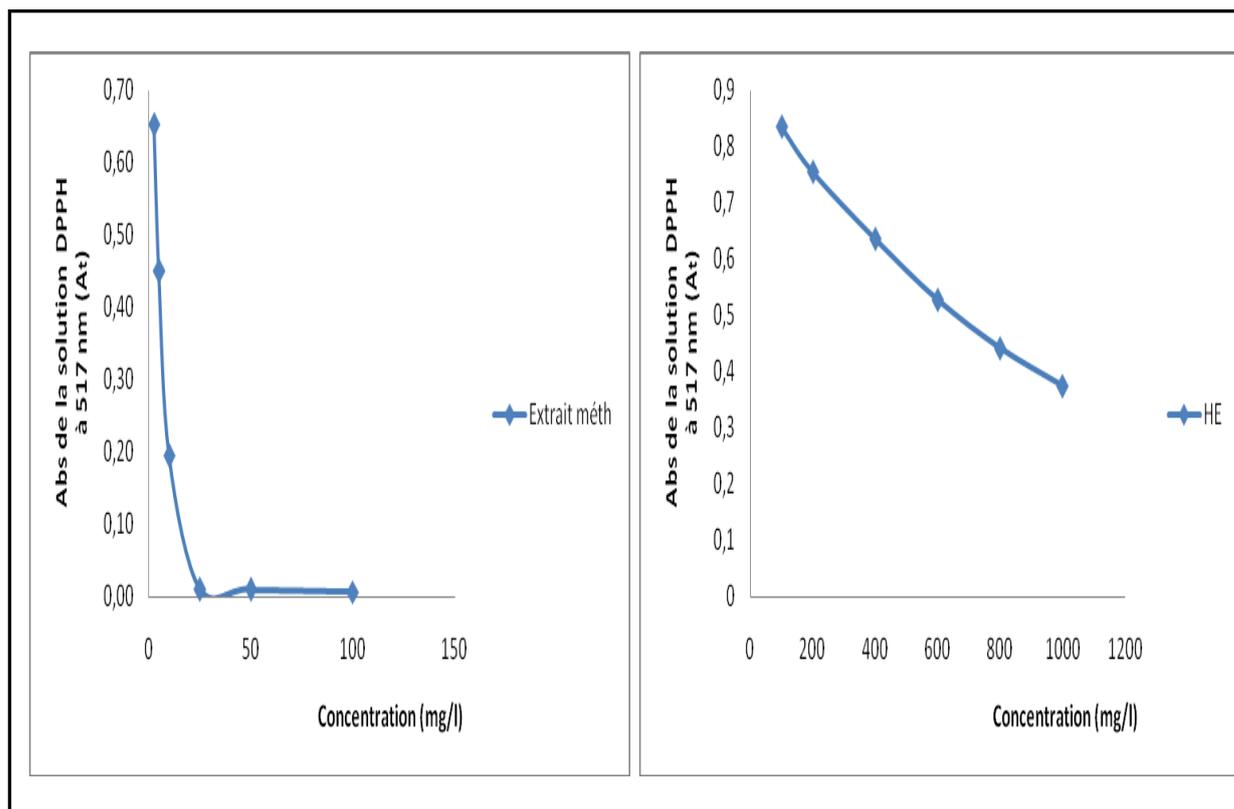


Figure 3.27: Evolution de l'absorbance des solutions des échantillons testés en fonction de différentes concentrations.

### 3.3.2. Evolution de l'inhibition radicalaire

Le profil d'activité antiradicalaire de chaque substance testée vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans les figures 3.28 et 3.29.

La figure 3.28 montre que l'acide gallique et le tocophérol atteignent une inhibition maximale respectivement de 100% et 95%. Cette inhibition augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration des témoins positifs. Néanmoins, nous observons que l'inhibition est obtenue avec de faibles concentrations en témoins (acide gallique de 2,5 mg/l et 10 mg/l en tocophérol).

L'extrait méthanolique réagit de manière identique que les témoins. Néanmoins, l'inhibition radicalaire totale n'est obtenue qu'après une concentration de 25 mg/l de l'extrait méthanolique.

L'HE réagit de manière différente en comparaison avec l'extrait méthanolique. En effet, l'inhibition radicalaire n'est pas totale car, elle est de 60% à une forte concentration (1000 mg/l) en HE.

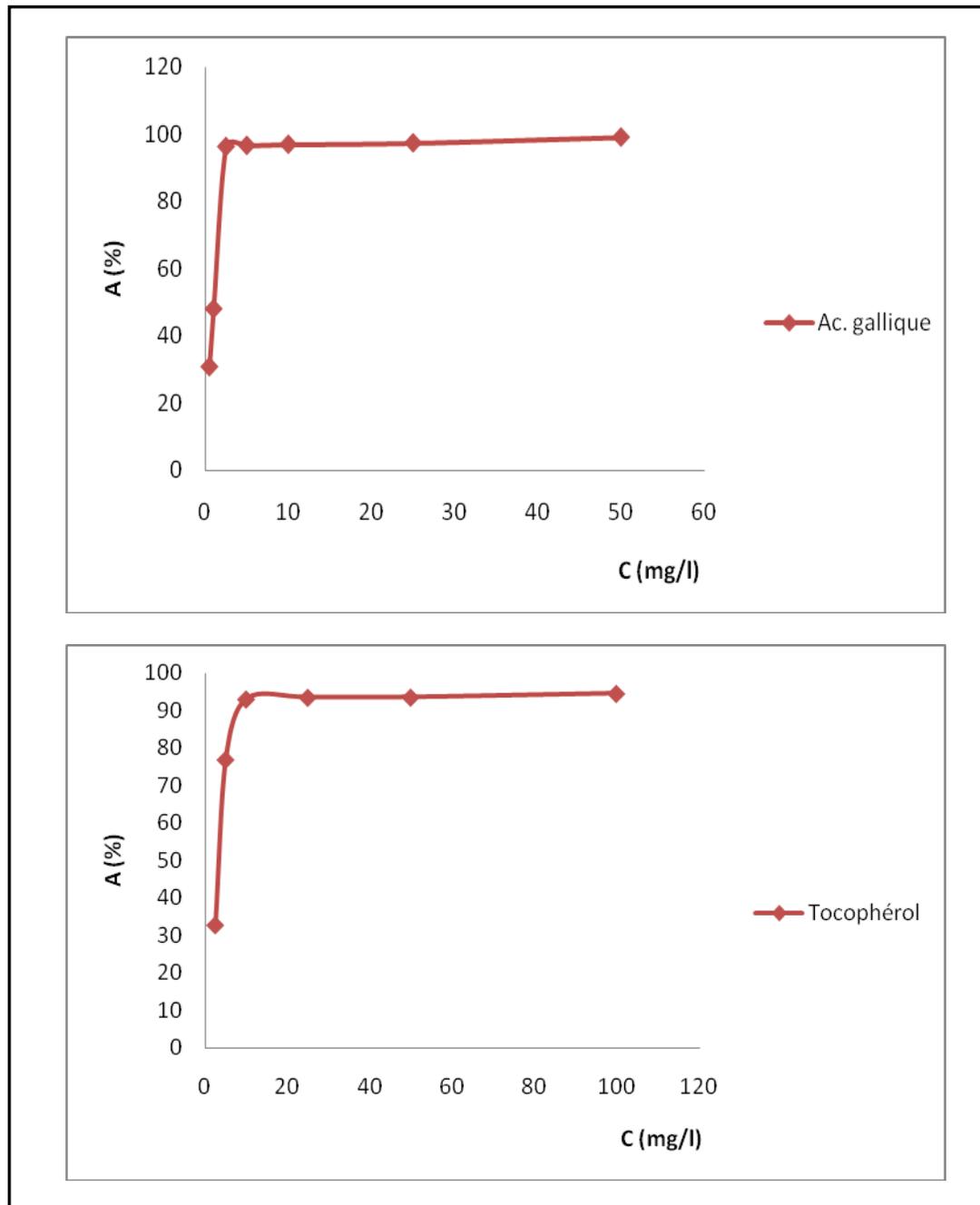


Figure 3.28: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des témoins testés en fonction de différentes concentrations.

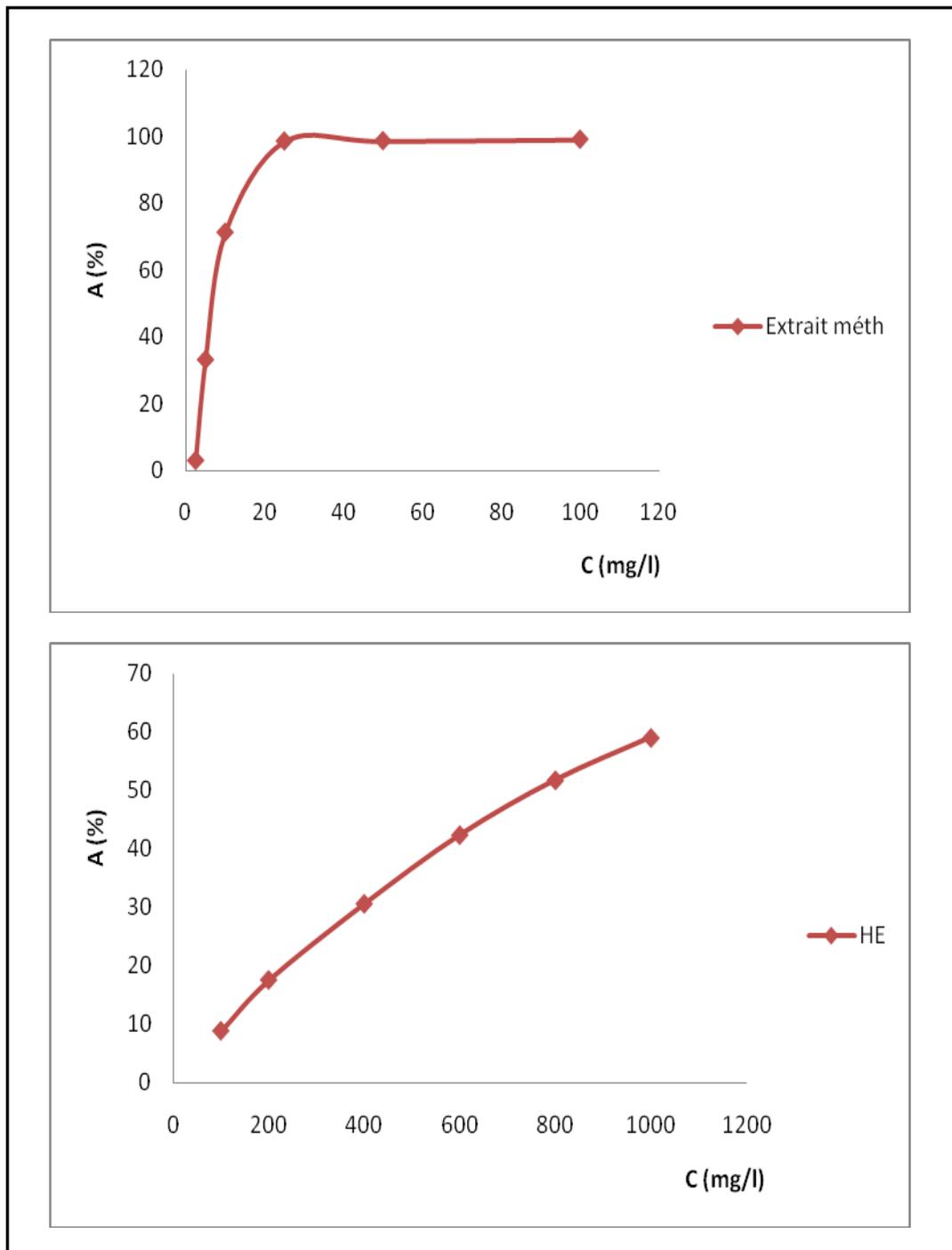


Figure 3.29: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des échantillons testés en fonction de différentes concentrations.

### 3.3.3. Estimation du pouvoir antioxydant des extraits de mélisse

L'activité inhibitrice des extraits de mélisse exprimée par EC50 est illustrée par la figure 3.30.

Ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité du DPPH (couleur) [77].

Ces EC50 sont déterminés graphiquement à partir des représentations  $A \% = f(C)$  pour chaque substance et exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire le DPPH en solution de 50%.

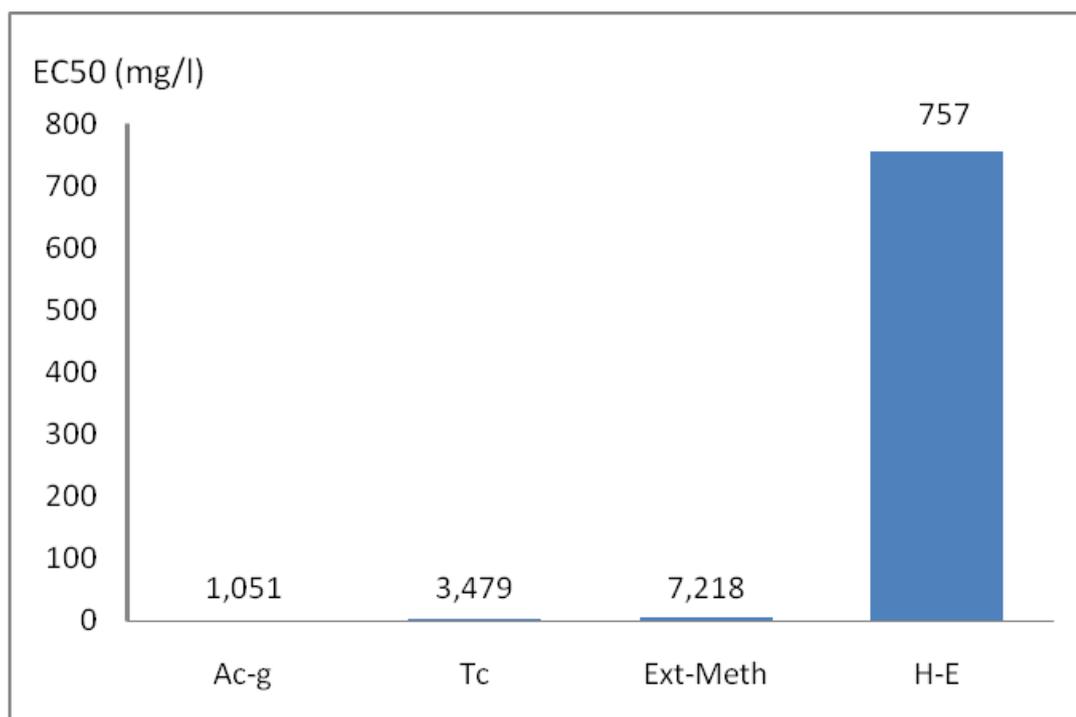


Figure 3.30: Classement croissant des substances testées selon leur EC50.

Comme représenté dans la figure 3.30, les valeurs d'EC50 sont très faibles pour les témoins, en l'occurrence l'acide gallique et le tocophérol (entre 1 et 3,5 mg/l). Ces derniers sont d'excellents antioxydants.

Nous signalons que l'extrait méthanolique présente une EC50 faible et relativement proche de celle des témoins. Au contraire, l'HE montre une valeur en EC50 très élevée, elle est de 757 mg/l.

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

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes. Ces derniers sont d'excellents antioxydants naturels. Au contraire, l'activité antioxydante des HE de la mélisse est très faible car elle est riche en composés phénoliques.

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

### 3.4. Résultats de l'activité antimicrobienne de *Melissa officinalis*.

#### 3.4.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et d'un antifongique

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de deux ATB de famille différente. Les résultats des mesures des zones d'inhibition figurent dans le tableau 3.9.

La plupart des souches bactériennes ont montré une sensibilité vis-à-vis des deux ATB. Néanmoins, *S. aureus* est une souche résistante à ces ATB et *P. aeruginosa* résiste à la pénicilline mais elle est sensible à la gentamycine (Figure 3.31).

Concernant la levure *Candida albicans*, une zone moyenne d'inhibition de 15 mm a été obtenue sous l'action de l'antifongique "Amphotéricine B" (Figure 3.32).

Tableau 3.9: Résultats de l'antibiogramme (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Souches \ ATB	La pénicilline	La gentamicine
<i>Escherichia coli</i>	23	20
<i>Bacillus subtilis</i>	39	43
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	34
<i>Enterococcus faecalis</i>	28	19

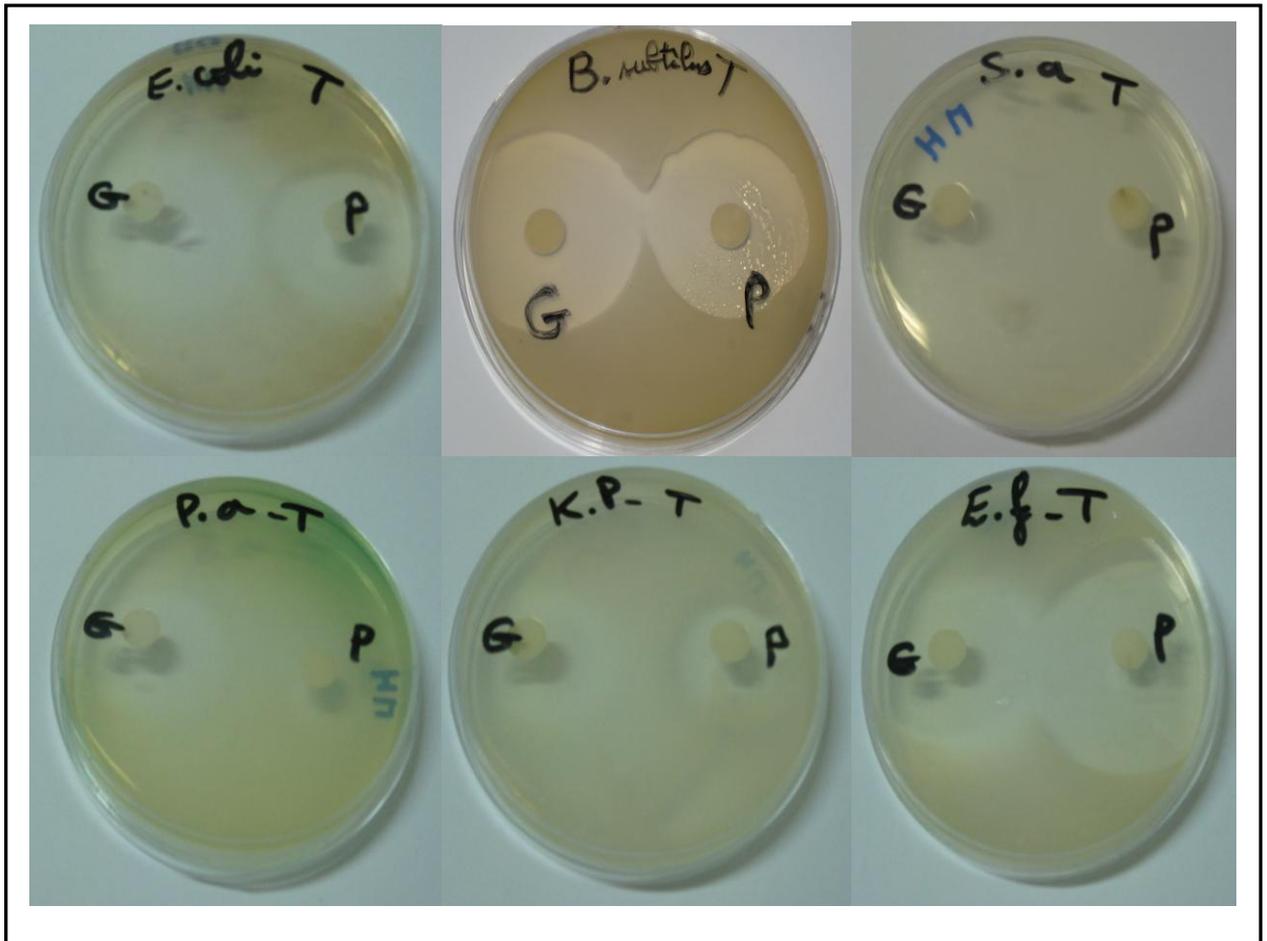


Figure 3.31: Résultats de l'incubation des souches testées par antibiogramme (originale).

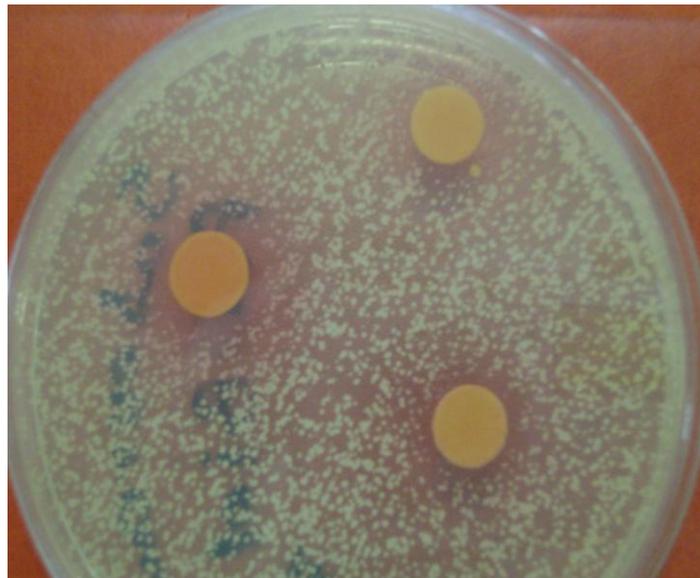


Figure 3.32: Résultats de l'antifongogramme (originale).

### 3.4.2. Test par diffusion sur gélose du pouvoir antimicrobien des extraits de la plante

#### 3.4.2.1. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Melissa officinalis* L. sont consignés dans le tableau 3.10.

Tableau 3.10: Résultats de l'aromatogramme

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	27	Inhibition
<i>Bacillus subtilis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	45	Inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	31	Inhibition
<i>Candida albicans</i>	0	Pas d'inhibition

Nous pouvons remarquer l'absence de zone d'inhibition pour les souches: *B. subtilis*, *P. Aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *C. albicans* (Figure 3.33). En l'occurrence, l'HE de la Mélisse n'a aucun effet sur ces germes.

Nous signalons la présence de zones d'inhibition importantes au niveau des souches *S. aureus* et *E. faecalis* ainsi que pour *E. coli* (Figures 3.34; 3.35 et 3.36). Ce résultat montre l'efficacité de l'HE de la mélisse sur l'inhibition de la croissance de ces germes.

Nous avons observé que l'HE de la mélisse agit fortement sur *S. aureus* alors que les antibiotiques de référence, pénicilline et gentamicine n'ont pas d'effet sur ce germe

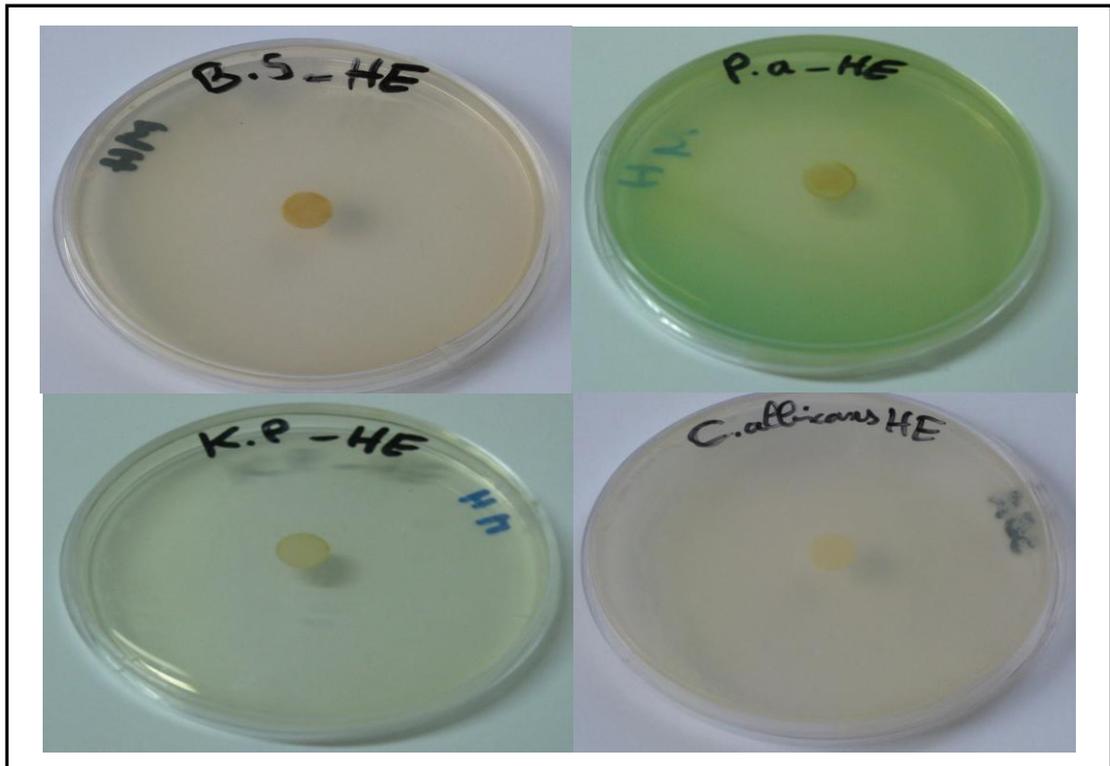


Figure 3.33: Résultats de l'incubation des souches testées par HE (Absence de ZI).



Figure 3.34: ZI de *S. aureus* par l'HE.



Figure 3.35: ZI d'*E. faecalis* par l'HE.



Figure 3.36: ZI d'*E. coli* par l'HE.

### 3.4.2.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'hydrolat

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HA de *Melissa officinalis* L. sont consignés dans le tableau 3.11.

Tableau 3.11: Effet de l'hydrolat de *Melissa officinalis* L. sur les souches microbiennes.

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Bacillus subtilis</i>	22	Inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	Inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	0	Pas d'inhibition

D'après ces résultats, nous remarquons un effet important de l'hydrolat de *Melissa officinalis* L. sur *S. aureus* et *B. subtilis* (Figures 3.37 et 3.38). En effet, nous observons un fort effet inhibiteur sur ces germes. Néanmoins l'effet le plus marquant est obtenu sur *Staphylococcus aureus*

Au contraire, aucune zone d'inhibition n'apparaît avec *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* et *C. albicans* (Figure 3.39).

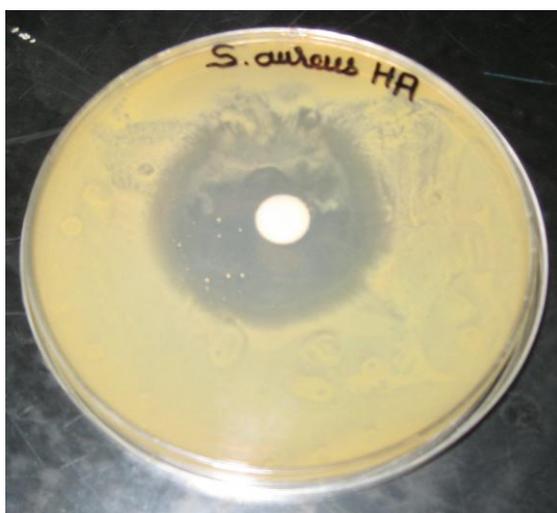


Figure 3.37: ZI de *S. aureus* par l'HA.

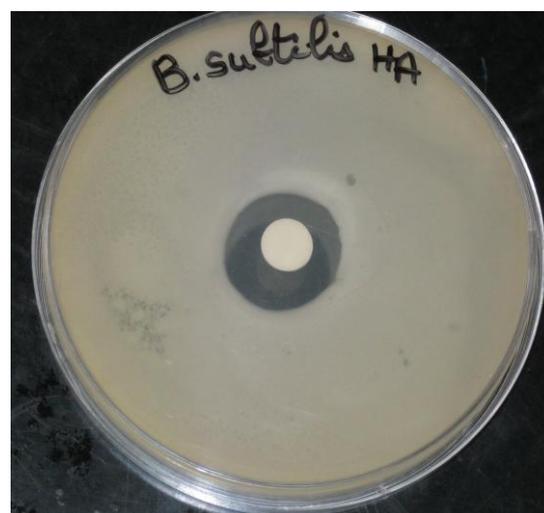


Figure 3.38: ZI de *B. subtilis* par l'HA.

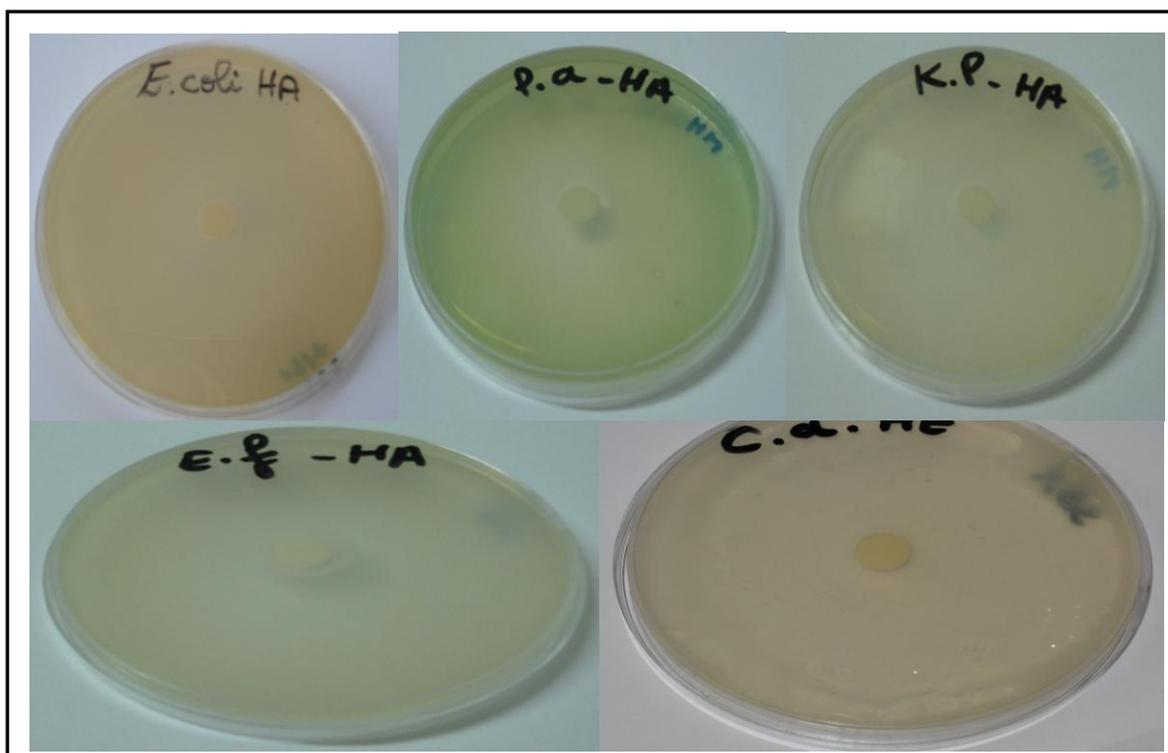


Figure 3.39: Résultats de l'incubation des souches testées par HA (Absence de ZI).

#### 3.4.2.3. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* L. a été dilué dans de l'éthanol qui est en parallèle testé sur les souches. Les résultats de l'activité antimicrobienne sont consignés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12: Effet de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. sur les souches microbiennes.

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Bacillus subtilis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	13	Inhibition

Testé sur tous les germes étudiés, l'éthanol (témoin) n'a pas d'effet antimicrobien. L'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. dilué inhibe uniquement la levure *C. albicans* dont on observe une relative sensibilité (Figures 3.40 et 3.41). Ce résultat serait éventuellement dû à une forte dilution par l'éthanol de l'extrait polaire de la mélisse.

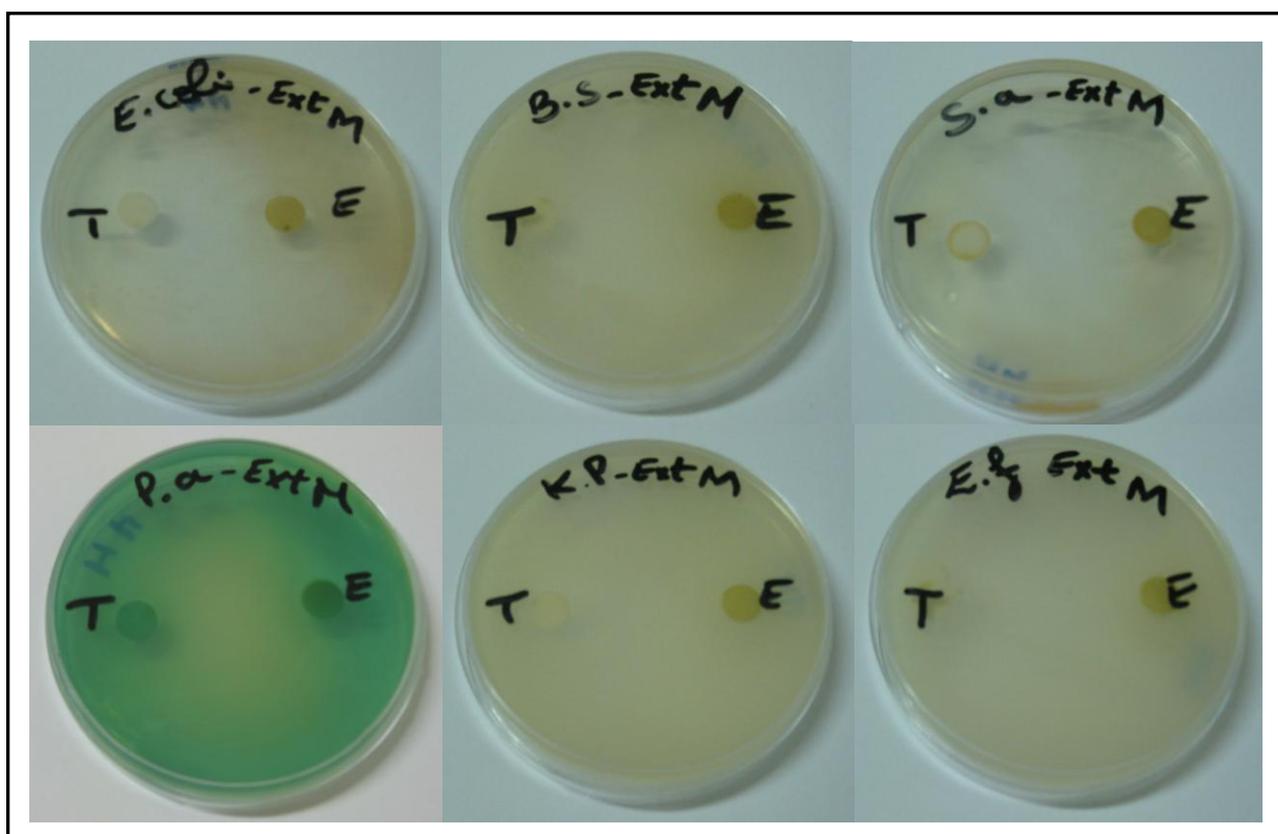


Figure 3.40: Résultats de l'incubation des souches testées par l'extrait polaire (Absence de ZI).

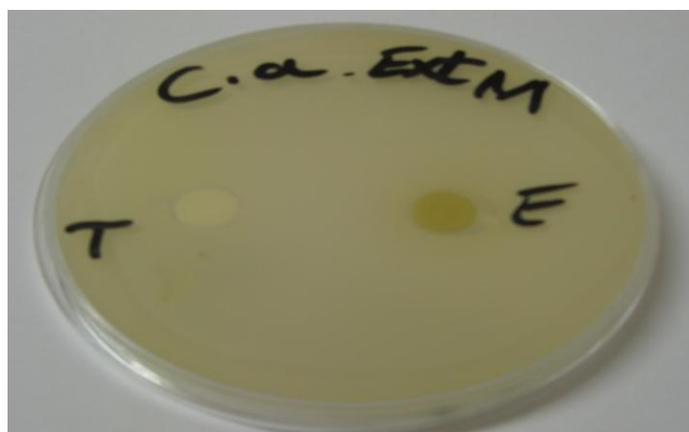


Figure 3.41: ZI de *C. albicans* par l'extrait polaire.

### 3.4.2.4. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'infusion

L'expérience menée sur les infusions de *Melissa officinalis* L. (10% et 30 %) s'est révélée négative. Ces infusés n'ont donc aucun effet antimicrobien (tableau 3.13.; Figure 3.42).

Tableau 3.13: Effet des infusions (10% et 30 %) de *Melissa officinalis* L. sur les souches microbiennes.

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Bacillus subtilis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	0	Pas d'inhibition

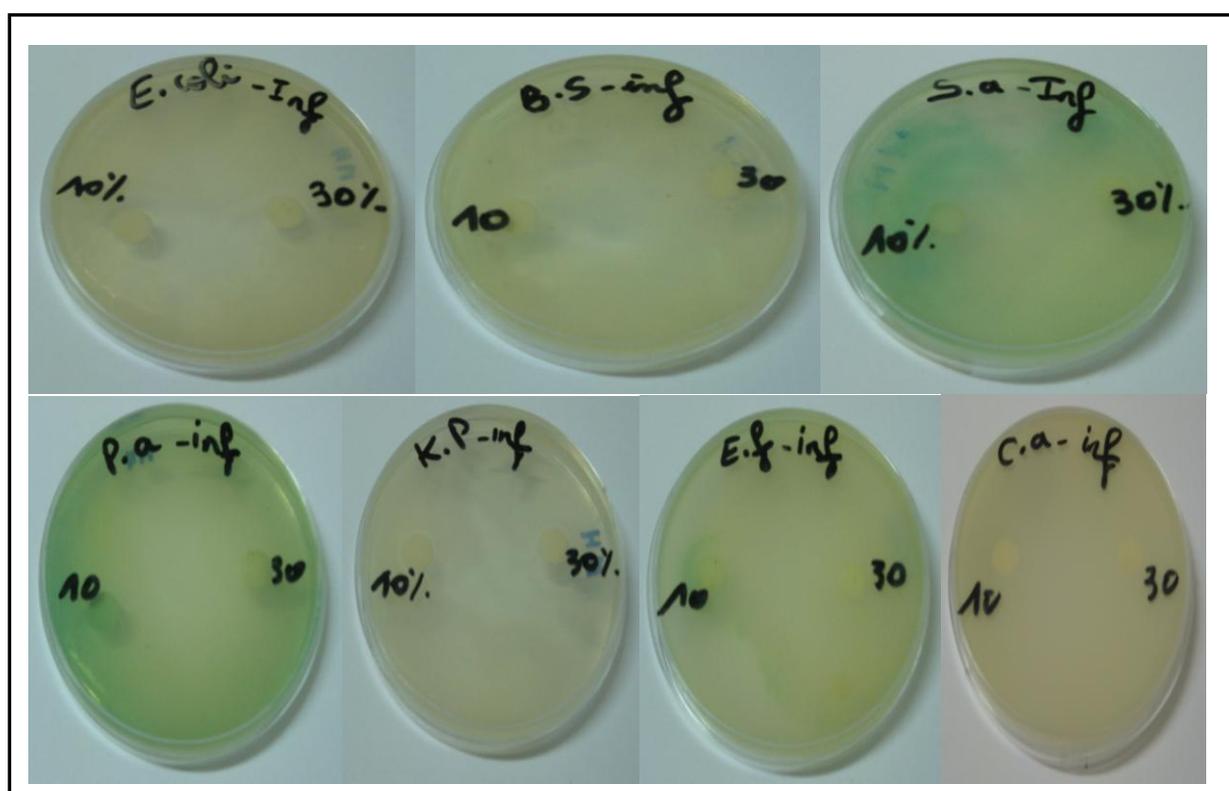


Figure 3.42: Résultats de l'incubation des souches testées par l'infusé 10% et 30% (Absence de ZI).

## CONCLUSION

La science moderne, en étudiant et analysant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer leur valeur mais, elle veut préciser, comparer et classer leurs diverses propriétés quelles soient bénéfiques ou non. Cette étude a pour but de grouper les plantes à effets similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître et éviter celles qui sont toxiques pour l'Homme.

Le présent travail avait pour objectif de déterminer la composition chimique de *Melissa officinalis* L., très utilisée en Algérie, et d'en connaître éventuellement le ou les principes actifs lui conférant des propriétés thérapeutiques.

L'utilisation des procédés d'extraction tel que l'entraînement à la vapeur d'eau et le soxhlet a permis de séparer et de quantifier les molécules volatiles et non volatiles. Ainsi, nous avons obtenu un rendement moyen de 0,17 % en huile essentielle à propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie.

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse est une technique fine qui a permis d'identifier la composition chimique 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 de terpène, oxyde terpénique, sesquiterpène et d'ester.

Cependant la chromatographie sur couche mince ne nous a permis qu'une caractérisation des métabolites secondaires recherchés, dont les flavonoïdes, les tanins et les coumarines par l'utilisation de révélateurs chimiques.

L'extraction séparément des principaux composés actifs nous a permis d'en déterminer la teneur dans la plante. Elle est de 7,6 % pour les tanins et 0.6 % pour les hétérosides flavoniques.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possède l'extrait méthanolique de la mélisse à piéger les radicaux libres. Cette propriété est due au fait que l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes. C'est un puissant antioxydant.

L'effet antimicrobien de *Melissa officinalis* L., a été étudié sur des germes standardisés cultivé sur milieu gélosé. Cet effet se révèle très important vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* pour l'ensemble des extraits de la mélisse.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* constitue une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Dans le domaine de génie génétique, il serait intéressant d'étudier la possibilité d'exploiter cette plante pour la production de nouveaux antibiotiques. Des études complémentaires *in vivo* seraient nécessaires pour évaluer les autres effets de la mélisse.

## APPENDICE A

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRIVIATIONS

AFNOR : Association Française de normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

OMS : Organisation mondiale de la Santé

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

CCM : Chromatographie sur couche mince

HE : Huile essentielle

HA : hydrolat

MP : Microscope photonique

GX : Grossissement

C.T. : Coupe transversal

Z.I : Zone d'inhibition

Ac : acide

MG : matière grasse

°C : Degrés Celsius

DO : densité optique

g : gramme

cm : centimètre

mm : millimètre

mn : minute

ml : millilitre

µl : microlitre

nm : nanomètre

UV-vis : Ultra violet- visible

## **APPENDICE B**

### **Appareillage**

#### **B1. Liste des appareillages**

- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Chauffe ballon
- Bain marie
- Evaporateur rotatif
- CGMS
- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Bec benzène
- Loupe binoculaire
- Microscope photonique
- Spectrophotomètre UV – Vis
- Four à moufle

## B2. Photos de l'appareillage



Le cryostat



Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau



La décantation



Le rotavapeur

## APPENDICE C

### Verrerie, consommables et réactifs

#### **C1. Liste de la verrerie et consommables:**

- Béchers : 100 cc ,400 cc, 500 cc, 600 cc
- Erléne Meyer 100 cc, 250 cc, 500 cc, 3000 cc 5000 cc
- Ballon à fond plat à col rodé
- Ballon sans fond
- Ampoules à décanter
- Tube à essai
- Pipettes graduées
- Entonnoirs
- Micropipette
- Pincés
- Anse de platine
- Portoirs
- Lames en verre et lamelles
- Ecouvillons stériles
- Boite de Pétri
- Disques d'antibiogramme stériles
- Pipettes Pasteurs
- Tubes à essai

## **C2. Liste des solutions et réactifs utilisés:**

- Ether diéthylique
- Méthanol
- Ether de pétrole
- Ethanol 95°
- Butanol
- Acide acétique
- Acétate d'éthyl
- Chloroforme
- Eau distillée
- Sulfate de magnésium

## APPENDICE D

### RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES

Tous les résultats de chaque test sont exprimés par la moyenne de trois répétitions (n=3)

Chaque moyenne est représentée par la (Moyenne  $\pm$   $\sigma$ )

$\sigma$ : écart-type.

Tableau 1: Teneur en eau de *Melissa officinalis* L.

	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	T
1 <sup>er</sup> essai	100,0517	26,1030	73,9105
2 <sup>ème</sup> essai	97,9636	28,0211	71,3964
3 <sup>ème</sup> essai	103,7820	24,7265	76,1746
Moyenne	100,5990	26,2835	73,8272
Ecart-type	2,4067	1,3511	1,9516

P<sub>1</sub>: Poids initial; P<sub>2</sub>: Poids sec.

Tableau 2 : Teneur en cendres de *Melissa officinalis* L.

	P (g)	Cendres (g)	T (%)
1 <sup>er</sup> essai	1,0003	0,1112	11,1167
2 <sup>ème</sup> essai	1,0085	0,1118	11,0858
3 <sup>ème</sup> essai	1,0110	0,1126	11,1375
Moyenne	1,0066	0,1119	11,1133
Ecart-type	0,0046	0,0006	0,0212

Tableau 3: Rendement en HE de *Melissa officinalis* L.

	Poids de la plante (moyenne en g)	Poids de l'HE (moyenne en g)	Rendement (%)
1 <sup>er</sup> essai	899,9675	1,4553	0,1617
2 <sup>ème</sup> essai	732,5102	1,4053	0,1918
3 <sup>ème</sup> essai	746,0000	1,2735	0,1707
Moyenne	792,8259	1,3780	0,1747
Ecart-type	75,9605	0,0767	0,0126

Tableau 4: Teneur en composés apolaires de *Melissa officinalis* L.

	Poids de la poudre (moyenne en g)	Poids de la concrète Ap (moyenne en g)	Pourcentage (%)	Poids de la concrète P (moyenne en g)	Pourcentage (%)
1 <sup>er</sup> essai	40,0069	4,0748	10,1852	14,2497	35,6181
2 <sup>ème</sup> essai	40,0131	4,6156	11,5352	15,4918	38,7168
Moyenne	40,0100	4,3452	10,8602	14,8708	37,1675
Ecart-type	0,0031	0,2704	0,6750	0,6210	1,5493

## APPENDICE E

### RESULTATS DE LA CCM

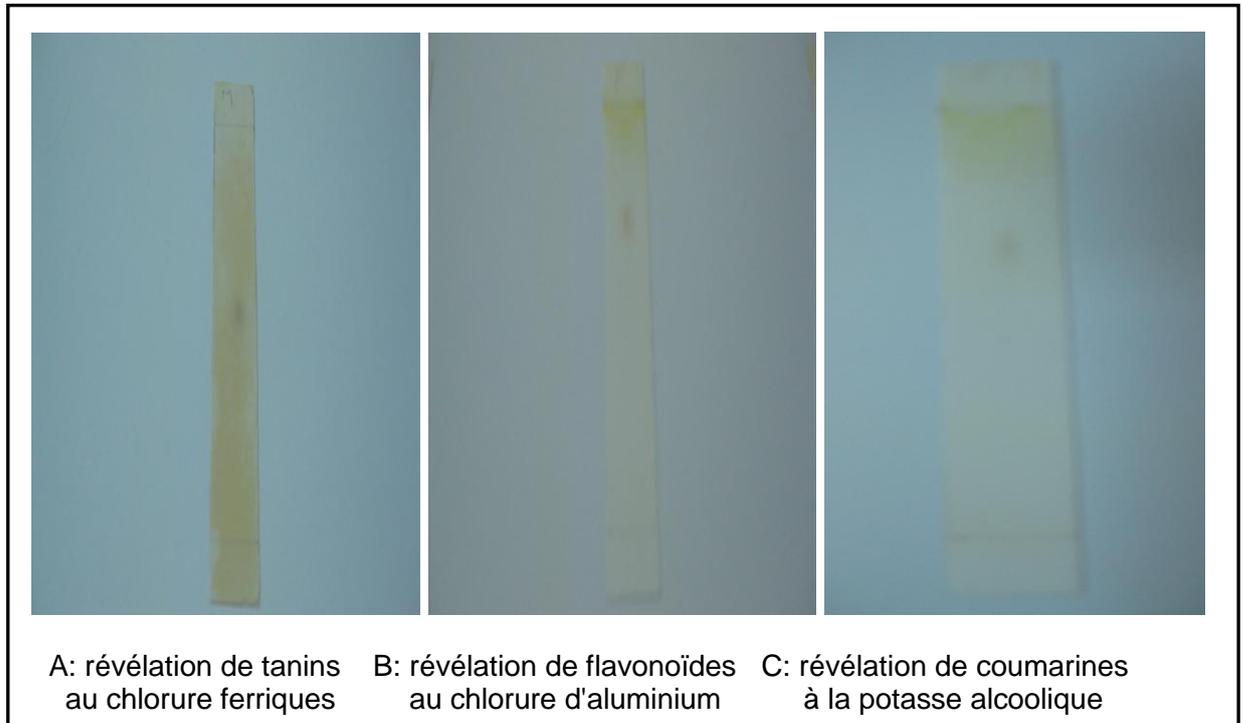


Figure 1: Plaques de CCM pour l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* L après révélation (originale).



Figure 2: Plaque de CCM pour l'extrait de tanins de *Melissa officinalis* L.



Figure 3: Plaque de CCM pour l'extrait de flavonoïdes de *Melissa officinalis* L.

## APPENDICE F

### RESULTATS DU TEST ANTIOXYDANT



Virage de la couleur du DPPH du violet foncé au jaune pâle

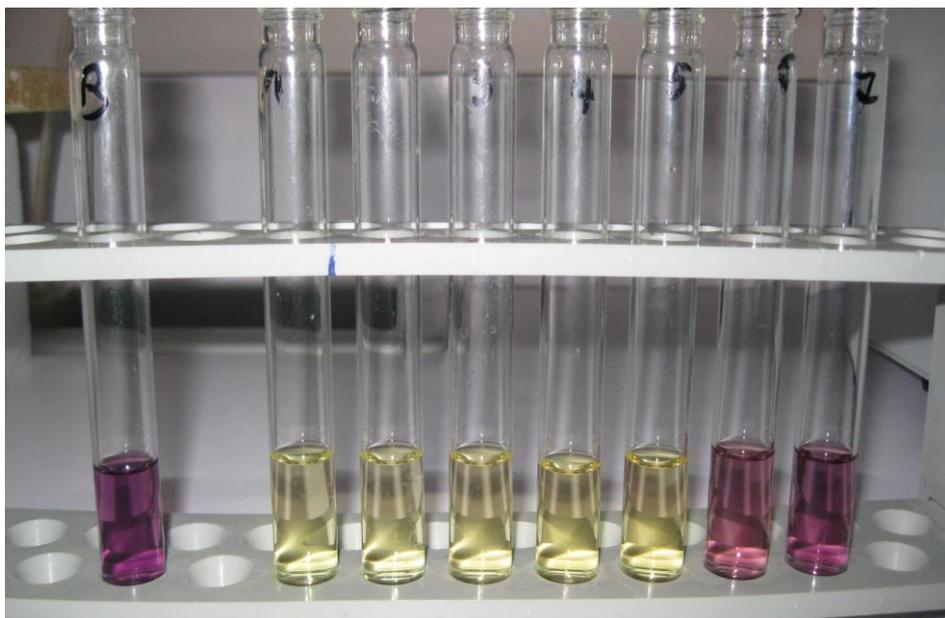


Tableau 1: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'ac. gallique.

<b>C mg/l</b>		<b>A<sub>0</sub></b>	<b>A<sub>t</sub></b>	<b>A%</b>
0,5	Essai 1	0,605	0,409	32,397
	Essai 2	0,612	0,418	31,699
	Essai 3	0,606	0,431	28,878
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,419</b>	<b>30,991</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,009</b>	<b>1,521</b>
1	Essai 1	0,605	0,319	47,273
	Essai 2	0,612	0,310	49,346
	Essai 3	0,606	0,316	47,855
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,315</b>	<b>48,158</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,873</b>
2,5	Essai 1	0,605	0,020	96,694
	Essai 2	0,612	0,022	96,405
	Essai 3	0,606	0,026	95,710
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,023</b>	<b>96,270</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,413</b>
5	Essai 1	0,605	0,018	97,025
	Essai 2	0,612	0,021	96,569
	Essai 3	0,606	0,023	96,205
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,021</b>	<b>96,600</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,335</b>
10	Essai 1	0,605	0,019	96,860
	Essai 2	0,612	0,017	97,222
	Essai 3	0,606	0,020	96,700
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,019</b>	<b>96,927</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,218</b>
25	Essai 1	0,605	0,040	93,388
	Essai 2	0,612	0,002	99,673
	Essai 3	0,606	0,006	99,010
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,016</b>	<b>97,357</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,017</b>	<b>2,820</b>
50	Essai 1	0,605	0,003	99,504
	Essai 2	0,612	0,007	98,856
	Essai 3	0,606	0,007	98,845
Moyenne		<b>0,608</b>	<b>0,006</b>	<b>99,068</b>
Ecart-type		<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,308</b>

Tableau 2: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le tocophérol

<b>C mg/l</b>		<b>A<sub>0</sub></b>	<b>A<sub>t</sub></b>	<b>A%</b>
2,5	Essai 1	0,845	0,582	31,124
	Essai 2	0,846	0,574	32,151
	Essai 3	0,888	0,576	35,135
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,577</b>	<b>32,803</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,003</b>	<b>1,701</b>
5	Essai 1	0,845	0,223	73,609
	Essai 2	0,846	0,167	80,260
	Essai 3	0,888	0,205	76,914
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,198</b>	<b>76,928</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,023</b>	<b>2,715</b>
10	Essai 1	0,845	0,057	93,254
	Essai 2	0,846	0,059	93,026
	Essai 3	0,888	0,063	92,905
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,060</b>	<b>93,062</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,002</b>	<b>0,145</b>
25	Essai 1	0,845	0,066	92,189
	Essai 2	0,846	0,045	94,681
	Essai 3	0,888	0,056	93,694
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,056</b>	<b>93,521</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,009</b>	<b>1,025</b>
50	Essai 1	0,845	0,034	95,976
	Essai 2	0,846	0,062	92,671
	Essai 3	0,888	0,071	92,005
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,056</b>	<b>93,551</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,016</b>	<b>1,736</b>
100	Essai 1	0,845	0,044	94,793
	Essai 2	0,846	0,043	94,917
	Essai 3	0,888	0,054	93,919
Moyenne		<b>0,860</b>	<b>0,047</b>	<b>94,543</b>
Ecart-type		<b>0,020</b>	<b>0,005</b>	<b>0,444</b>

Tableau 3: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique

<b>C mg/l</b>		<b>A<sub>0</sub></b>	<b>A<sub>t</sub></b>	<b>A%</b>
2,5	Essai 1	0,690	0,662	4,058
	Essai 2	0,664	0,643	3,163
	Essai 3	0,667	0,652	2,249
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,652</b>	<b>3,157</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,008</b>	<b>0,739</b>
5	Essai 1	0,690	0,439	36,377
	Essai 2	0,664	0,444	33,133
	Essai 3	0,667	0,466	30,135
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,450</b>	<b>33,215</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,012</b>	<b>2,549</b>
10	Essai 1	0,690	0,213	69,130
	Essai 2	0,664	0,166	75,000
	Essai 3	0,667	0,203	69,565
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,194</b>	<b>71,232</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,020</b>	<b>2,671</b>
25	Essai 1	0,690	0,017	97,536
	Essai 2	0,664	0,008	98,795
	Essai 3	0,667	0,006	99,100
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,010</b>	<b>98,477</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,005</b>	<b>0,677</b>
50	Essai 1	0,690	0,010	98,551
	Essai 2	0,664	0,008	98,795
	Essai 3	0,667	0,011	98,351
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,010</b>	<b>98,566</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,001</b>	<b>0,182</b>
100	Essai 1	0,690	0,002	99,710
	Essai 2	0,664	0,016	97,590
	Essai 3	0,667	0,002	99,700
Moyenne		<b>0,674</b>	<b>0,007</b>	<b>99,000</b>
Ecart-type		<b>0,012</b>	<b>0,007</b>	<b>0,997</b>

Tableau 4: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'HE

<b>C mg/l</b>		<b>A<sub>0</sub></b>	<b>A<sub>t</sub></b>	<b>A%</b>
100	Essai 1	0,914	0,829	9,300
	Essai 2	0,918	0,834	9,150
	Essai 3	0,916	0,843	7,969
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,835</b>	<b>8,806</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,006</b>	<b>0,595</b>
200	Essai 1	0,914	0,756	17,287
	Essai 2	0,918	0,761	17,102
	Essai 3	0,916	0,749	18,231
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,755</b>	<b>17,540</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,005</b>	<b>0,494</b>
400	Essai 1	0,914	0,630	31,072
	Essai 2	0,918	0,628	31,590
	Essai 3	0,916	0,649	29,148
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,636</b>	<b>30,603</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>1,051</b>
600	Essai 1	0,914	0,544	40,481
	Essai 2	0,918	0,526	42,702
	Essai 3	0,916	0,513	43,996
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,528</b>	<b>42,393</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,013</b>	<b>1,452</b>
800	Essai 1	0,914	0,451	50,656
	Essai 2	0,918	0,432	52,941
	Essai 3	0,916	0,442	51,747
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,442</b>	<b>51,781</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	<b>0,933</b>
1000	Essai 1	0,914	0,386	57,768
	Essai 2	0,918	0,374	59,259
	Essai 3	0,916	0,365	60,153
Moyenne		<b>0,916</b>	<b>0,375</b>	<b>59,060</b>
Ecart-type		<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>0,984</b>

## REFERENCES

1. Beloued, A., “ Plantes médicinales d’Algérie ”, Edition office des publications universitaires, (09-2005), 284p.
2. Delille L., “ Les plantes médicinales d’Algérie ”, Berti éditions, Alger, (2007), 240p.
3. Baba Aïssa, F., “ Les plantes médicinales en Algérie ”, Coédition Bouchène et Ad. Diwan, Alger, (1991), 97 p.
4. Grünwald J. et Jänicke C., “ Le guide de la phytothérapie ”, Edition Marabout, (2006), 416p.
5. Sallé, J. L., “ Le totum en phytothérapie – Approche de phyto-biothérapie ”, Editions Frison-Roche, Paris, (1991), 239p.
6. Albouy, V., “ Le jardin médicinal, pas à pas : soignez-vous avec les produits de votre jardin ”, Editions de la Lesse, Aix-en-Provence, France, (2008), 95p.
7. Anne-Sophie et Nogaret-Ehrhart, “ La phytothérapie – se soigner par les plantes ”, Edition Groupe Eyrolles, (2003), Deuxième tirage 2006, 191p.
8. Roland J.C., “ Des plantes et des hommes ”, Edition Vuibert, (Octobre 2002), 165 p.
9. Schauenberg, P. et Paris, F., “ Guide des plantes médicinales – Analyse, description et utilisation de 400 plantes ”, Edition Delachaux et Niestlé S.A., Neuchâtel Switzerland, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, (1977), 396 p.
10. Anton, R. et Wichtl, M., “ Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique ”, 2<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, (2003), 692p.
11. Huard, D., “ Les huiles essentielles – L'aromathérapie ”, Editions Quebecor, (1999), 197 p.

12. Sallé, J. L., “ Les huiles essentielles – Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie ”, Editions Frison-Roche, Paris, (1991), 167 p.
13. Thurzova, L., “Les plantes – santé qui poussent autour de nous ”, Edition Bordas, (1981), imprimé en Mars 1985, 268 p.
14. Paris R. R. et Moyse H., “ Précis de matière médicale – Pharmacognosie générale ”, Edition Masson, Paris, Tome 1, 2° édition, (1976), 420 p.
15. Cecchini, T., avec la collaboration de Ticli, B., “ Encyclopédie des plantes médicinales ”, Editions De Vecchi S.A., Paris, (2003), 351p.
16. Fluck, H., “ Petit guide panoramique des herbes médicinales : Description simple avec des indications sur leurs principes actifs, leur action, leur emploi, leur récolte et leur culture ”, Edition Delachaux et Niestlé S.A., Neuchâtel, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, (1977), 165p.
17. Carlier, V., “ Herbier médicinal ”, Aubanel, une marque des éditions Minerva, Genève Suisse, (2005), 215p.
18. Raynaud J., “ Prescription et conseil en phytothérapie ”, Edition Lavoisier, (2005), 215p.
19. Ticli, B., “ Votre herbier – 160 plantes médicinales ”, (2006), 218p.
20. Valnet, J., “ Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes ”, Edition Maloine S.A., Paris, 5<sup>ème</sup> édition, (1983), 942p.
21. Moati, R., Fauron, R. et Donadieu, Y., “ La phytothérapie – Thérapeutique différente ”, Edition Maloine S.A., Paris, (1983), 245 p.
22. Bruneton, J., “ Plantes toxiques – Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux ”, Edition Lavoisier, 3<sup>ème</sup> édition, (2005), 618 p.
23. Bruneton, J., “ Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ”, Tec et doc édition Lavoisier, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, (1999), 1120p.
24. Iserin, P., “ Encyclopédie des plantes médicinales ”, Edition Larousse, (2001), p.10-17 & p.132.

25. Verdrager, J. “ Les plantes médicinales dans les traitements modernes ”, Edition Maloine S.A., Paris, (1978), 233 p.
26. Andreas, B., “ Guide des plantes du bassin méditerranéen ”, édition Française, Les éditions Eugen Ulmer, (1998), 400p.
27. Teuscher, E., Anton R. et Lobstein A., “ Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles ”, (2005), 522p.
28. Padrini, F. et Lucheroni, M.T., “ Le grand livre des huiles essentielles ”, Editions De Vecchi S.A., Paris, (2003), dépôt légal : Avril 2006, 206p.
29. Quezel P. et Santa S., “ Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ”, Edition Centre National de la Recherche Scientifique, France, Paris, Tome 2, 7<sup>e</sup>édition, (1963), 595 p.
30. <http://www.botanique.org>
31. Angiosperm Phylogeny Group (1998), "An ordinal classification for the families of flowering plants", Annals of the Missouri Botanical Garden; Vol. 85, No. 4 (1998), pp. 531-553, 23p.
32. Aït Youssef M., “ Plantes médicinales de Kabylie ”, Editions Ibis Press, Paris, (2006), 349p.
33. Girre L., “ Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments ”, édition Delachaux et Niestlé S.A., Paris, (2001), Dépôt légal : Mars 2006, 253p.
34. Arnal-Schnebelen, B. et all, “ Santé Référence Phytothérapie: La santé par les plantes ”, Edition Sélection du Reader's Digest, S.A., Paris, (2007), 447p.
35. Burrows, I., “ La nature comestible”, Edition française Delachaux et Niestlé, Paris, (2005), 144 p.
36. Baba Aissa, F., “ Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb ”, copyright librairie, Alger, (1999), 368 p.
37. [http://www.herbalpedia.com/lemon\\_balm-hoy\\_profile.pdf](http://www.herbalpedia.com/lemon_balm-hoy_profile.pdf)

38. Spichigher, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. et Jeanmonod, D., “ Botanique systématique des plantes à fleurs ”, Edition presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2<sup>e</sup> édition (2002), 413 p.
39. McClintock, D. et Fitter, R.S.R., “ Les guides du naturaliste – Guide des plantes à fleurs de l’Europe occidentale ”, Delachaux et Niestlé S.A., Neuchâtel Switzerland, (1964), 325 p.
40. Boullard, B., “ Dictionnaire: Plantes & champignons ”, Editions ESTEM, (1997), 875p.
41. Podlech, D., “ Gros plan – Les plantes de santé ”, (1988), 257p.
42. Genders, R., Hazelton, N.S., et Wolfert, P., “ Herbes et épices – Botaniques et technologie ”, Edition Berger-Levrault, (Septembre 1982), 191p.
43. Barnes, J., Anderson, L.A. et Phillipson, J.D., “ Herbal Medicines ”, Third edition, Edition pharmaceutical press, (2007), 710 p.
44. Nedelec, P.Y., “ Larousse du jardin : Toutes les techniques 1000 plantes de A à Z ”, édition Larousse, (1993), 607p.
45. Gilly, G., “ Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à grasse : Botanique – Culture – Chimie - Production et marché ”, Edition L’Harmattan, France, (2005), Dépôt légal Juillet 2007, 417p.
46. Elabed, D. et Kambouche, N., “ Les huiles essentielles ”, Editions Dar El Gharb, (2003), 91 p.
47. Svoboda, K.P., Svoboda, T.G., Syred, A.D. and Syred, P.M., “ Secretory structures of aromatic and medicinal plants ”, edition copyright british library, (2000), 61 p.
48. Telphon, T., “ ABC des huiles essentielles ”, Editions Grancher, (2003, 2005, imp 2008), 399 p.
49. Festy, D., “ Ma bible des huiles essentielles ”, Editions leduc.S, Paris, (2007), 549 p.

50. Sallé, J. L., “ Les huiles essentielles: synthèses d'aromathérapie ”, Editions Frison-Roche, Paris, 2<sup>e</sup> édition (2004), 220p.
51. « "tanins" Encyclopédie Microsoft® Encarta® en ligne »  
<http://fr.encarta.msn.com> © 1997-2008 Microsoft Corporation.
52. Volak, J. et Stodola, J., “ Plantes médicinales ”, Grund, Paris, 1983. 298p.
53. “ Wikipedia, encyclopédie libre en ligne ” - « <http://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin> ».
54. Charpentier, B., Hamon-Lorléac'H, F., Harlay, A., Huard, A. et Ridoux, L., “ Guide du préparateur en pharmacie ”, Edition Masson, Paris, (1998), 1242 p.
55. Bruneton, J., “ Pharmacognosie - phytochimie, plantes médicinales ”, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, (2009), 1288 p.
56. “ Wikipedia, encyclopédie libre en ligne ”  
" <http://fr.wikipedia.org/wiki/Flavono%C3%AFde> "
57. Guinard, J. L., Cosson, L. et Henry, M., “ Abrégé de phytochimie ”, Edition Masson, Paris, (1985), 224 p.
58. Fintelmann, V. et Weiss, R.F., “ Manuel pratique de phytothérapie ”, Editions Vigot, (2004), 438 p.
59. Twidwell, E.K., Wagner, J.J. et Thiex, N.J., “Use a microwave oven to determine moisture content of forages”, ExEx 8077, (2002), p 2.
60. Simpson, W.T., “Drying and control of moisture content and dimensional changes”, Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-113, Madison, Forest products laboratory (1999), 463p.
61. “Pharmacopée européenne”, 5<sup>e</sup> édition, Strasbourg, Conseil d'Europe, (2005), p 2600.
62. Makan, N.D., “Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali: *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae) ”, Thèse de doctorat d'état en

pharmacie, Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie, université de Bamako, (2003), 78p.

63. Pinta, M., “ Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux - Oléagineux ”, 280 année, n°2, France, (1973), p1.
64. Pinta, M., “ Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux”, Comité inter-instituts d'étude et techniques analytiques du diagnostic foliaire, Sevilla, (Septembre 1968), pp 12-13.
65. Caree, P., “ Précis de technologie et de chimie industrielle ”, Edition Ballière JB et fils, Tome 3 (1953), 170p.
66. De maak, F. et Sablier, M., “ Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse”, Techniques de l'ingénieur - Traité, Analyse et Caractérisation, (1997), pp 2614.
67. Rouessac, F., “ Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes”, Edition Dunod, 5<sup>ème</sup> édition, (2000), 219 p.
68. Hennebelle, T., “Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants”, Thèse de doctorat en chimie organique et macromoléculaire, Ecole doctorale sciences de la matière, du rayonnement et de l'environnement, université des sciences et technologies de Lille 1, (2006), 304p.
69. Djabou, N., “*Sambucus nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle du nord africaine”, Thèse de magister en chimie organique appliquée, Faculté des Sciences - Département de Chimie, université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, (2006), 123p.
70. William, B.J., “The original of the soxhlet extractor”, Journal of Chemical Education, Volume 84, n°12, Canada, (2007), pp 1913.
71. “ Wikipedia, encyclopédie libre en ligne ”

" [http://fr.wikipedia.org/wiki/image:Soxhlet\\_extractor.png](http://fr.wikipedia.org/wiki/image:Soxhlet_extractor.png) "

72. Houghton, P. J. and Raman A., "Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts", Edition Chapman et Hall, 1ère éd., Londres, (1998), pp 29-31.
73. Lagnika, L., "Etude phytochimique et activité biologique des substances naturelles isolées de plantes Béninoises", Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, université Louis Pasteur Strasbourg, (2005), 268p.
74. Guignard, J-L., " Biochimie végétale ", Editions Masson, Paris, 2<sup>ème</sup> édition, (2000), 281p.
75. Chikhoun, A., " Huiles essentielles de thym et d'origan", Thèse de magister en agronomie, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, (2007), 168p.
76. Mohammedi, Z., " Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen", Thèse de magister en biologie, Faculté des Sciences - Département de Biologie, université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, (2006), 105p.
77. Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl - DPPH for estimating antioxidant activity", Sci. technol, (2004), pp 211-219.
78. Hazzit, M., " Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie", Thèse de doctorat en chimie, Faculté de chimie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, (2008), 130p.
79. Sanchez-Moreno, C., Lurrari, J-A. and Saura-Calixo, F.A., "Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols", J. Sci. Food Agric., (1998), pp 76, 270-276.
80. Lafont, R., " Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ", (2005),  
"<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html> "