

Liste des tableaux

Tableau I: Souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	p14
Tableau II : Conditions opératoires de la CGMS.....	p18
Tableau III: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés.....	p31
Tableau IV: Résultats du rendement en huile essentielle.....	P37
Tableau V: Caractéristiques organoleptiques de l'HE.....	p37
Tableau VI: Les composés présents dans l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>.....	p39
Tableau VII: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires.....	p42
Tableau VIII: Résultats de la teneur en tanins.....	p45
Tableau IX : Résultats de la teneur en flavonoïdes.....	p45
Tableau X: Résultat de l'activité anti microbienne de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>.....	p50
Tableau VI: Résultat de l'activité anti microbienne de l'hydrolat de <i>Melissa officinalis</i>.....	P50
Tableau XII : Matériel non biologique.....	(Annexe I)

Liste des figures

Figure N°1 : Mélisse officinale (<i>Melissa officinalis</i>).....	P6
Figure N°2 : Aspect général de <i>Melissa officinalis</i>	P7
Figure N°3 : Feuille de mélisse opposée décussées.....	P8
Figure N°4 : Fleur de <i>Melissa officinalis</i>	P8
Figure N°5 : <i>Melissa officinalis</i> L. (Original).....	P13
Figure N°6 : Séchage de <i>Melissa officinalis</i> L. (Original, 2015).....	P14
Figure N°7 : Montage du dispositif Clevenger.....	P17
Figure N°8 : Système d'extraction au soxhlet (Original, 2015).....	P20
Figure N°9 : Protocole expérimental de l'extraction des composés non volatils polaires et apolaires par Soxhlet.....	P21
Figure N°10 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des tanins.....	P24
Figure N°11 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des flavonoïdes.....	P26
Figure N°12 : Forme libre et réduite du DPPH.....	P27
Figure N°13 :Position des disques dans la boîte de Pétri.....	P30
Figure N°14 : Schéma simplifié du principe de la méthode des chromatogrammes	P31
Figure N°15 : Vue d'une partie de la tige à la loupe Gx 2.5 (originale).....	P32
Figure N°16 : Vue d'une feuille (faces supérieure et inférieure) à la loupe binoculaire (originale)	P33
Figure N°17 : Coupe transversale au niveau de la tige Gx 10 (originale).....	P34
Figure N°18 : Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40 (originale).....	P34
Figure N°19 : Observation microscopique des poils au niveau de la tige de <i>Melissa officinalis</i> Gx10.....	P35
Figure N°20 : Coupe transversale au niveau de la feuille Gx 10 (originale).....	P35

Figure N°21: Coupe transversale au niveau de la tige Grx 40 (originale).....	P36
Figure N°22 : Poils épidermiques de la <i>Mélisse officinalis</i>	P36
Figure N°23: Chromatogramme de l'HE extraite par hydrodistillation et analysée par la CG-MS (originale, 2016).....	P38
Figure N°24: Spectre de masse de citronella (Originale, 2016).....	P40
Figure N°25: Spectre de masse de Z-Citral (Originale, 2016).....	P40
Figure N°26 : Spectre de masse du (E)- Citral (Originale, 2016).....	P40
Figure N°27: Spectre de masse de Acetate de Neryl (Originale, 2016).....	P41
Figure N°28 : Spectre de masse de Trans (Beta) caryophyllène (Originale, 2016.....	P41
Figure N°29 : Spectre de masse du Germacrène D (Originale, 2016).....	P41
Figure N°30: Teneur en composés apolaires et polaires de <i>Melissa officinalis L</i>	P43
Figure N°31: Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de <i>Melissa officinalis L</i> . (originale).P44	
Figure N°32: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de <i>Melissa officinalis L</i> . (originale).P44	
Figure N°33: Evolution de l'absorbance de l'extrait méthanolique testés en fonction de différentes concentrations.....	P47
Figure N°34: Evolution de l'absorbance de l'huile essentielle testée en fonction de différentes concentrations.....	P47
Figure N°35: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire de l'extrait méthanolique testés en fonction de différentes concentrations.....	P48
Figure N°36: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des échantillons testés en fonction de différentes concentrations.....	P48
Figure N°37: Classement croissant des substances testées selon leur EC50.....	P49
Figure N°38: Résultat de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et l'hydrolat de <i>Mélisse officinalis</i>	P51

Table des matières

IntroductionP1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités

I.1. La phytothérapie et les plantes médicinales

I.1.1. phytothérapie.....	P2
I.1.2. Bienfaits et avantages de la phytothérapie.....	P2
I.1.3. Place de la médecine traditionnelle en Monde	P2
I.1.4. Place de la médecine traditionnelle en Algérie	P3
I.1.5.Plantes médicinales.....	P3
I.1.6.Mode de préparation.....	P3

I.2.Généralités sur la mélisse

I.2.1.Historique.....	P5
I.2.2. <i>Melissa officinalis</i> L. au sein de la taxonomie	P5
I.2.3.Description morphologique	P6
I.2.4.Dénomination vernaculaire	P9
I.2.5.Habitat et répartition.....	P9
I.2.6.Culture et Récolte	P10
I.2.7. Principales familles de métabolites secondaires chez <i>Melissa officinalis</i>	P10
I.2.7.1. Les huiles essentielles.....	P10
I.2.7.2.Les tanins	P11
I.2.7.3.Les flavonoides.....	P11
I.2.8.Utilisation traditionnelle et contemporaine Partie expérimentale.....	P12

Chapitre II : Matériel et Méthode

II.1. Matériel biologique.....	P13
II.1.1.Matériel végétal.....	P13
II.1.2.Microorganismes	P14
II.2 .Matériel non biologique.....	P15

II .3. Etude botanique de la plante <i>Melissa officinalis</i> (coupes histologiques).....	P15
II. 4. Etude Phytochimique de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P16
II.4.1. Etudes des principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P16
A. Etude des composés volatils.....	P16
❖ Extraction de l'HE de mélisse par hydrodistillation.....	P16
❖ Analyse de l'huile essentielle par CG-MS	P17
B. Etude des composés non volatils polaires et apolaires	P19
❖ Extraction au soxhlet.....	P19
❖ Analyse des fractions polaires et apolaires par spectrophotomètre UV-visible.....	P21
II.4.2.Extraction de certains principes actifs de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P22
❖ Extraction et détermination de la teneur en tanins.....	P22
❖ Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes	P25
II. 3.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Melissa officinalis</i>	P27
II.4. Etude de l'activité antimicrobienne de <i>Melissa officinalis</i>	P29

Chapitre III. Résultat et Discussions

III.1. Résultats de l'étude botanique de la plante.....	P32
III.1.1.Etude macroscopique	P32
III.1.2.Etude microscopique	P33
III.2.Etude phytochimique de <i>Melissa officinalis</i> L.....	P37
A. Etude des composés volatils.....	P37
❖ Extraction et rendement en huile essentielle.....	P37
❖ Composition chimique d'huile essentielle.....	P38
B) Etude des composés non volatils apolaires et polaires.....	P42
❖ Résultat de l'extraction au soxhlet.....	P42
❖ Analyse des fractions par spectrophotométrie UV-visible.....	P44
❖ Résultats de l'extraction des tanins.....	P45
❖ Résultats de l'extraction des flavonoïdes.....	P45
III. 3. L'Activitéantioxydante.....	P46
III. 4. L'Activité antimicrobienne	P50

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

Résumé

En Algérie, *Melissa officinalis* est plante appartenant à la famille des Lamiacées.

est assez commune est largement cultivée. Elle est populairement réputée pour son action calmante des tensions nerveuses.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer le pouvoir antimicrobien et antioxydant et l'identification des sites de stockage de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*.

L'étude des coupes histologiques au niveau de la feuille et la tige ont permis d'identifier les sites de stockage de l'huile essentielle qui sont les poils sécréteurs à tête vésiculaire.

L'extraction de l'huile essentielle de cette plante effectuée par la méthode d'hydrodistillation a donné un rendement de 0.16%.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CGMS) a révélé six constituants majoritaires avec une teneur différente : Citronellal (16.83%), Germacrène (D) (12.45%), (trans) β caryophyllène (15.48%), Acetate de Neryl (11.78%), (E)-Citral (16.16%), (Z)-Citral (15.48%).

L'étude phytochimique des composés non volatils a permis de quantifier une teneur de 9.75% des composée apolaires, 22.5% des composés polaires ,4.53% de tanins et 0.43% des flavonoïdes.

L'activité anti oxydante testée par la méthode de DPPH a montré que l'extrait méthanolique de la mélisse présente une forte activité anti oxydante par rapport à celle de l'Huile essentielle.

Le pouvoir antimicrobien de l'hydrolat et l'huile essentielle de mélisse officinale est testés sur trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*), une levure (*Candida albicans*).

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* L.,a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis du *candida albicans* (45mm),*Pseudomonas aeruginosa* (37mm) *Staphylococcus aureus* (21mm), et *Echerichia coli* (16mm).par contre l'hydrolat a un effet inhibiteur sur *Candida albicans* (25mm) mais qui demeure toujours inférieure à celui de l'huile essentielle.

Mots clés : plantes médicinales, *Melissa officinalis* L., huile essentielle, effet antioxydant, effet antibactérien, flavonoïdes, tanins.

Abstrac

The aim of our work is to evaluate the antimicrobial and antioxidant power of a medicinal plant *Melissa officinalis*, plant belonging to the Lamiaceae family.

In Algeria, this rather common plant is widely cultivated. It is popularly renowned for its calming nervous tension.

The study histological sections at the leaf and stem have identified the essential oil storage sites that are glandular in vesicular head.

The essential oil extraction of the plant made by the method of steam distillation gave a yield of 0.16%.

The gas chromatography coupled with mass spectrometry (CGMS) revealed six majority constituents with different content: Citronellal (16.83%), germacrene (D) (12.45%), (trans) β caryophyllene (15.48%), Acetate of neryl (11.78%), (E) - Citral (16.16%), (Z) -Citral (15.48%).

The phytochemical study of non-volatile compounds quantified grading 9.75% nonpolar comprised 22.5% of polar compounds, 4.53% from 0.43% tannins and flavonoids.

The antioxidant tested by the method of DPPH activity showed that the methanol extract of Melissa has a high antioxidant activity compared to that of the essential oil.

The antimicrobial capacity of the hydrosol and essential oil of lemon balm are tested on three bacterial strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*), a yeast (*Candida albicans*).

The essential oil of *Melissa officinalis* L., exercised an important activity inihibtrice vis-à-vis the *candida albicans* (ZI = 45mm), *Pseudomonas aeruginosa* (ZI = 37mm) *Staphylococcus aureus* (ZI = 21mm) and *Escherichia coli* (ZI = 16mm) .By against hydrolat it has an inhibitory effect on *Candida albicant*. (ZI = 25mm) but still remains below that of the essential oil.

Keywords: medicinal plants, *Melissa officinalis* L., essential oil, antioxidant, antibacterial effect, tannins, flavonoids.

الملخص

في الجزائر *Mélissa officinalis* هي نبتة تنتمي الى عائلة Lamiacées. هذه النبتة شائعة الى حد كبير و تزرع في نطاق واسع تشتهر شعبيا بفضل فعلها المهدئ للتوتر العصبي

الهدف من دراستنا هو تقييم القدرة المضادة للأكسدة وللميكروبات ومعرفة مقر تخزين الزيوت العطرية

Mélissa officinalis

تمت دراسة البنية الخلوية لكل من الورقة الساق بهدف تحديد اماكن تخزين الزيت الاساسي التي توجد على مستوى الشعيرات الافرازية .

تم استخراج الزيت الطيار من النبتة بطريقة التقطير بالبخار حيث اعطنا مردود ب 0.16% .

اما تقنية الكروماتوغرافية الغازية المقرونة بطيف الكتلة مكننا من التعرف على التركيب النوعي للزيت العطري بنسب مختلفة : (trans) β caryophyllène (15.48%), Germacrène(D) (12.45%), Citronellal (16.83%) ,

.Acetate de Neryl (11.78%), (E)- Citral (16.16%), (Z)-Citral (15.48%)

الدراسة الكيميائية للنبات للمكونات الغير طيارة مكننا من معرفة نسب المركبات الاقضية 9.75% القطنية 22.5%- الدباغ 4.53% - الفلافونويد 0.43% .

دراسة النشاط المضاد للأكسدة اظهر ان المركز الميثانولي للترنجان له نشاط فعال ضد الاكسدة اكثر من الزيت الطيار .

اما النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري و الحلاية المائية لنبتة الترنجان قمنا بدراسته على ثلاث مستعمرات بكتريا وعلى فطر

الزيت العطري للترنجان اظهر قد كبيرة على تثبيط :

candida albicans (45mm) - *Pseudomonas aeruginosa* (37mm)

Staphylococcus aureus (21mm) et *Echerichia coli* (16mm).

قدرة

اما بالنسبة للحلاية المائية تم تثبيط *Candida albicans* (25mm) لكن تبقى ضعيفة مقارنة بالزيت العطري

الكلمات المفتاحية نشاط مضاد للبكتيريا- نشاط مضاد للأكسدة - الزيت العطري -الترنجان- الدباغ - نباتات طبية

-الفلافونويد

I.1. La phytothérapie et les plantes médicinales

I.1.1. phytothérapie

Le mot phytothérapie se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phyton* et *therapeia* qui signifient respectivement plante et traitement. La phytothérapie peut donc se définir comme étant un traitement ou une prévention de certaines maladies par l'usage des Plantes (**Anton et Wichtl, 2003 ; Zeghad, 2009**).

Selon **Grünwald et Janick (2004)**, la phytothérapie utilise l'action des plantes Médicinales et correspond au traitement des maladies par ces plantes sous différentes formes, à dose pondérale.

I.1.2. Bienfaits et avantages de la phytothérapie

La phytothérapie moderne est une ramification de la médecine classique, elle est fondée sur l'emploi de substances actives d'origine végétale (plantes, lichens, champignon ou même algues) (**Grunwald et Janick, 2006**).

Elle s'est beaucoup développée ces dernières années, notamment grâce à une innovation technologique majeure : les extraits de plantes standardisés. En effet, il est établi depuis toujours que certaines plantes possèdent des activités bactéricides, antifongiques, antivirales, antimitotiques, antirhumatismales, immunostimulantes, hyper ou hypotensives, tonifiantes, antispasmodiques et d'autres (**Zhiri et Baudoux, 2005**).

La phytothérapie clinique individualisée est l'aboutissement d'une pratique millénaire de l'usage médicinal des plantes, combinée aux plus récentes recherches, et à une meilleure connaissance des dysfonctionnements physiologiques (**Zhiri et Baudoux, 2005**).

I.1. 3. Place de la médecine traditionnelle en monde

D'après l'**OMS (2003)**, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt à travers le monde.

En Chine, 40% environ de l'ensemble des soins s'inspirent de la médecine populaire.

En Amérique latine plus de 50% de la population ont recours à cette thérapie.

L'utilisation des plantes médicinales est très courante, elle se pratique dans Beaucoup des médecines traditionnelles, comme la médecine Chinoise et la médecine Tibétaine, (**Fintelman et Weiss, 2003**).

Par ailleurs, selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), près de 6377

Plantes sont utilisées en Afrique. Car, dans certains pays d'Afrique centrale, le savoir

Faire des guérisseurs traditionnels représente le seul moyen de traitement des maladies, Surtout celles qui ont une grande ampleur comme la malaria et le syndrome D'immunodéficience acquise (SIDA) (**Pousset, 1989**).

Ainsi, le pourcentage des populations ayant eu recours à cette pratique au moins Une fois est de: 48% en Australie, 70% au Canada, 49% en France et 42% aux Etats-Unis (**O.M.S, 2003**).

I.1.4. Place de la médecine traditionnelle en Algérie

Depuis des siècles, en Algérie comme dans tous les pays du Maghreb, les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées surtout dans les milieux ruraux par des personnes âgées qui connaissent encore certaines recettes de tisanes (**Quezel et Santa, 1963**).

Dans le Hoggar et en l'absence de médecine, dans certaines contrées isolées, les Touaregs se soignent avec les plantes médicinales et aromatiques dont ils connaissent le secret transmis de père en fils. De même, en Kabylie lorsque, les montagnards utilisent des plantes médicinales et aromatiques pour se soigner (**Quezel et Santa, 1963**).

En Algérie 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 (**Delille, 2007**).

I.1.5.Plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris, 1977**).

Cependant, de nombreuses plantes sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous formes de principes actifs comme précurseurs pour l'obtention des médicaments (**Magnami, 1979**).

I.1.6.Mode de préparation

On peut utiliser les plantes soit en les prenant par voie interne ou par voie externe (**Messésué, 1975**). Cependant les plantes se présentent sous plusieurs formes ; en générale c'est la tisane qui est la plus efficace. (**Goyet, 2013**).

Les préparations les plus courantes sont :

➤ Teinture :

C'est une extraction végétale qui permet, par une macération des plantes dans l'alcool d'en tirer les principes actifs solubles dans l'eau et dans l'alcool (**Lacosta, 2012**).

➤ **Infusion :**

Consiste à verser les plantes dans l'eau bouillante un temps plus au moins long (**Pierre et Lys, 2007**).

➤ **Décoction :**

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus au moins long (**Pierre et Lys, 2007**).

➤ **Sirop :**

Se Prépare avec du miel ou de sucre combinés avec une préparation de plantes en infusion ou en décoction (**Baba aissa, 2011**).

➤ **Crème :**

Ce sont des émulsions préparées à l'aide de substance grasse et de préparation de plantes (**Baba aissa, 2011**).

➤ **Poudre :**

Les plantes préparées sous forme de poudre obtenue par pulvérisation dans un mortier ou dans un moulin (**Delille, 2013**).

➤ **Lotion :**

Liquide obtenu par infusion ou décoction de la plante émolliente ou vulnérable que l'on utilise en les passant légèrement sur la partie à soigner à l'aide d'un coton hydrophile ou d'un linge fin imbibé (**Delille, 2007**).

I.2.Généralités sur la mélisse

I.2.1.Historique

Melissa officinalis est une vieille plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs (**Anrdracs, 1998**).

Avicenne (980-1037) la recommandait parce que, disait-il elle rendait le cœur joyeux par la suite il découvrit son action positive sur le tube digestif.

Ce sont les médecins arabes qui ont découvert les vertus médicinales de *Melissa officinalis* L. vers les Xe siècles, ils vantaient son pouvoir cordial « qui réjouit le cœur »ainsi que son remède contre la mélancolie (**Delaveau et al. 1989**).

Durant du XIX^e Siècles et mise au point par les religieux du Carmel, « l'Eau de Mélissa des carmes et de la chartreuse »est toujours utilisée et est employée contre les vertiges et les syncopes (**Delille, 2007**).

Une importante étude clinique effectuée en 1990 a montré l'efficacité de l'association Mélissa-Passiflore dans le traitement de l'anxiété (**Roux, 2005**).

I.2.2.*Melissa officinalis* L. au sein de la taxonomie

En 2009, l'APG III (Angiosperme phyllogeny group) proposait une nouvelle classification :

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| • Embranchement | Spermaphytes |
| • Sous-embranchement | Angiospermes |
| • Classe | Dicotylédones vraies |
| • Sous-classe | Asteridae |
| • Ordre | Lamiales |
| • Famille | <i>Lamiaceae</i> |
| • Genre | <i>Melissa</i> |
| • Espèce | <i>officinalis</i> L. |

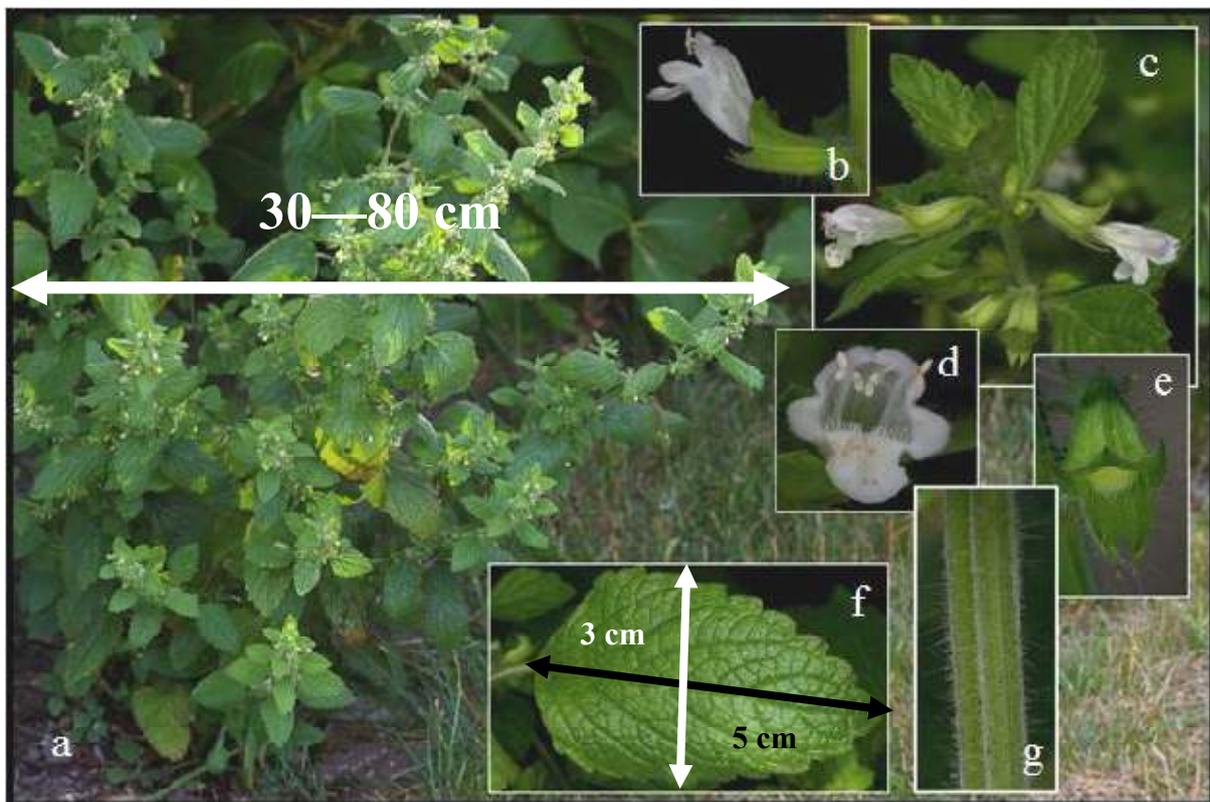
On distingue les sous-espèces suivantes :

- | | |
|----------------|--|
| • Sous espèces | <i>Melissa officinalis</i> L.ssp. <i>officinalis</i> |
| | <i>Melissa officinalis</i> L.ssp. <i>altissima</i> |
| | <i>Melissa officinalis</i> L .ssp. <i>Inodor</i> |

I.2.3. Description morphologique

La mélisse (**Figure 1a**) est une plante herbacée vivace à la tige carrée (**Figure 1g**), dressée et ramifiée, poussant en touffe, mesurant le plus souvent entre 30 et 80 centimètres de haut (**Perrot & Paris, 1971 ; Thoby, 2009**).

Les feuilles (**Figure 1f**), pétiolées, sont réparties de façon opposée et décussée sur la tige (**Wichtl & Anton, 2003**). Leurs bords sont fortement crénelés. Elles sont de forme ovale et cordiforme, aux nervures réticulées très saillantes sur la face inférieure, donnant cet aspect gauffré à la face supérieure. La surface est recouverte de fins poils courts (**Perrot & Paris, 1971**).



FigureN°1 : Mélisse officinale (*Melissa officinalis*)

<http://www.herbierimages.be>

a : plante entière ; b : fleur zygomorphe ; c : fleurs disposées en verticilles à la base des feuilles ; d : quatre étamines ; e : calice bilabié et pubescent ; f : feuille ; g : tige carrée.

Les fleurs sont regroupées par douzaine ou demi-douzaine, en verticille (**Figure 1c**), à la base des feuilles. De couleur blanche à rosée, elles sont formées d'une corolle tubulaire (**Figure 1b**) constituée de deux lèvres inégales. La lèvre supérieure est dressée (**Perrot & Paris, 1971**) et celle inférieure est divisée en trois lobes. Quatre étamines didynames (**Figure 1d**) s'insèrent sur le tube formé par la corolle, elles sont courbées et tendent ainsi les unes vers

Généralité

les autres. Le pistil, quant à lui, est constitué de quatre loges et possède un long style terminé par un stigmate. Le calice (Figure 1e) est bilabié et pubescent (**Wichtl & Anton, 2003**).

Le fruit est un tétrakène contenant de petites graines brunes, foncées et luisantes. La mélisse officinale peut parfois, notamment si elle est cueillie à l'état sauvage, être confondue avec d'autres plantes (**Wichtl & Anton, 2003 ; Babulka, 2005**) qui sont : la cataire citronnée (*Nepeta cataria* var. *citriodora*), la mélisse des bois (*Melittis melissophyllum*), la mélisse à grandes fleurs (*M. grandiflora* Sm.) et la mélisse de Moldavie (*Dracocephalum moldavicum*).

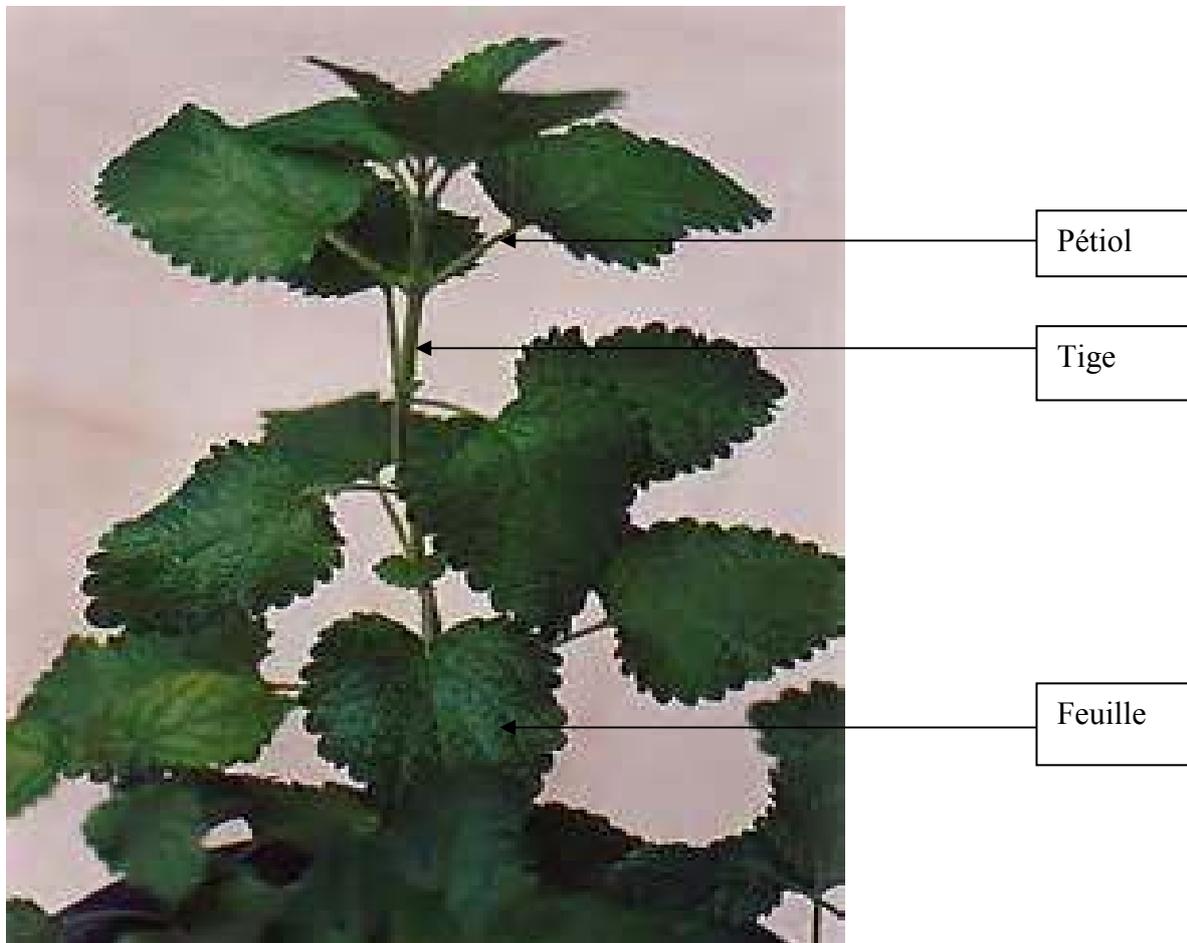


Figure N°2 : Aspect général de *Melissa officinalis* (original,2015)



Figure N° 3 : Feuille opposée décussées de *Mélissa officinalis* (Original,2015)



Figure N° 4 : Fleur de *Mélissa officinalis* (Original,2015)

I.2.4. Dénomination vernaculaire

Cette plante présente plusieurs noms vernaculaires :

- **Nom Arabe** : Habaq t-trunj, Merzizou (Ait Youssef, 2006), Tourounndjan (Baba Aissa, 2011).
- **Nom Berbère** : tifer n'zizoua, ferzizou, tizizuit.

Certains apiculteurs (notamment en Kabylie) emploient ou cultivent la mélisse pour attirer les abeilles ; cette pratique semble assez ancienne, d'où le nom de la plante en berbère « **Tifer n'zizoua** ». (BABA AISSA, 2011)

Le mot « **Troundjane** », est cité par Abderrazak El Djazairi qui en fait un synonyme de « **Badarendjouya** » terme persan dont le sens est « odeur de citron » d'après Ibn El Baitar. Selon Bouklarich, la plante est appelée « **Malissoufilon** » en grec, soit le **Melissophullon** de Discoïdes, (Mélissa= abeille et phyullon = feuille). (BABA AISSA, 2011).

- **Nom Français** : Citronnelle, Piment des abeilles, Thé de France, Poincirade, Citronade, Piment des ruches, pament des mouches (Bonnier, 1990)
- **Nom Anglais**: Lamon blam, Bee blam, Blam, Common Balm, Balm Mint, Pimentary (Bonnier, 1990)
- **Nom Allemand**: Melisse, Zitronen Melisse, Bienenkrant, Honibblatt, Apothken melisse (Bonnier, 1990)
- **Nom Italien**: Melissa, Cedroncella, Cetrone, Melacitola, Limona (Bonnier, 1990)

I.2.5. Habitat et répartition

Originaires de la région méditerranéenne orientale, elle pousse à l'état sauvage dans les pays chauds. On la retrouve, à l'état spontané, en touffe, dans les terrains vagues, aux abords d'habitations, dans les haies, aux pieds des murs et bords des chemins jusqu'à 1000 mètres d'altitude (Hayon, 2007 ; Boullard, 2001).

Elle s'est parfaitement acclimatée aux régions tempérées d'Europe occidentale. La mélisse pousse sur tout type de sols sauf les plus fluides. En sol léger et fertile elle peut même être envahissante. L'idéal pour cette plante est un sol drainé, chaud mais pas trop sec, sablonneux ou argileux-sablonneux, riche en humus et un emplacement ensoleillé. Elle peut pousser dans des endroits ombragés mais sa teneur en huile essentielle sera amoindrie (Teuscher et al., 2005).

Généralité

En Algérie, la mélisse est cultivée dans les régions de la Kabylie. Néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du tell, ou 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. **(Beloued, 2005 ; Baba Aissa, 1999)**

I.2.6. Culture et Récolte

Cultivée sur un sol profond et bien exposé au soleil, la récolte des feuilles aura lieu avant la floraison en raison de l'odeur de punaise développée par les fleurs, et par temps sec car les feuilles noircissent à l'humidité **(Hayon, 2007)**.

La récolte se fait à partir de la seconde année. Les feuilles se cueillent sur les jeunes pousses ne dépassant pas 30 centimètres, et on peut réaliser 2 à 3 récoltes par an si l'on prend soin de les cueillir régulièrement, de juin à septembre. La partie aérienne de la plante se récolte de juin à août. Le séchage se fait à l'ombre en dessous de 35 °C **(Delaveau et al., 1989)**

On conserve le tout dans un récipient fermé à l'abri de la lumière, de la poussière et de l'humidité, mais elle ne conservera pas son arôme au-delà d'une année, **(Thomson, 1981)**.

I.2.7. Principales familles de métabolites secondaires chez *Mélissa officinalis*

I.2.7.1. Les huiles essentielles (HE)

L'huile essentielle est responsable de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme « huile » s'explique par la propriété des huiles essentielles à se solubiliser dans les graisses.

Le terme « essentielle » fait référence à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante **(Zhiri et baudoux, 2005)**.

La teneur en HE varie de 0,05 à 0,3 %. Elle renferme majoritairement du citral (mélange de gèranial = 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. **(Anton et Wichtl 2003) ; (Teuscher et al, 2005)**.

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 (Anton et Wichtl 2003) ; (Teuscher *et al*, 2005).

❖ Localisation et formation

Les HE, produites par les végétaux supérieurs, sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, fleurs, racines, fruits, graines, écorces, etc.) (Elabed et Kambouche, 2003); (Bruneton, 1999)

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 (Elabed et Kambouche, 2003); (Bruneton, 1999).

I.2.7.2. Les tanins

Les tanins sont des mélanges complexes de polyphénols. Le principe actif est un phénol qui se combine avec les sucres. 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 (Volak et Stodola, 1983).

I.2.7.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes 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 (Charpentier *et al.*, 1998).

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 (Bruneton, 1999).

I.2.8.Utilisation traditionnelle et contemporaine

La mélisse vendue chez les marchands de menthe, a des propriétés stomachique, cholérétique et calmante (migraine, nervosité) **(Sijelmassi, 2008)**.C'est un sédatif, doux un calmant hypotensif, un anti-inflammatoire et cholérétique. Elle est donc tout indiqué pour soulager les insomnies, les crises de nerf, et pour régulariser la sécrétion de la vésicule biliaire de l'estomac **(Martinetti, 2013)**.

Selon Bruneton (1993) *Melissa officinalis* est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que le ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion.

Les feuilles aromatisantes et les sommités fleuris sont généralement les plus utilisées. Les feuilles possèdent des propriétés antispasmodiques, sédatives, antidépressives et antivirales **(Thurzova et al, 1985)**.

Iserin, (1997) indique que l'infusion de la mélisse, à raison d'un tasse trois fois par jours, agit contre les maux de tête d'origine nerveuse et apaise les palpitations cardiaques, de même, la tisane de la mélisse soulage la tension, apaise les rhumes et la grippe. L'utilisation de cette plante sous forme de cataplasme guérit les blessures.

La mélisse, *Melissa officinalis L.* est également utilisée comme insecticide. On peut disposer des feuilles dans le linge de maison pour le parfumer et éloigner les insectes, elle est également employée dans l'industrie des parfums **(Iserin, 1997)**.

Introduction

Les plantes sont depuis toujours utilisées par l'Homme à des fins curatives. Ce dernier a même, appris à apprécier leurs vertus apaisantes et analgésiques (**Iserin et al., 2001**).

Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la Médecine de nos grands parents, malgré l'important développement de l'industrie Pharmaceutiques qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies Souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base de plantes. (**El-Rhaffari et Zaid, 2004**)

En Algérie, les plantes médicinales et les remèdes à base de plantes n'ont jamais été Totalement abandonnés et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine Traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le Développement spectaculaire de la médecine moderne (**HAMZA, 2011**).

Vu la richesse du monde végétal et afin de contribuer à une meilleure connaissance de notre patrimoine naturel en plantes aromatiques et médicinales, notre choix s'est porté sur une espèce de la famille des *lamiaceae Melissa officinalis L.*

La mélisse, est une plante médicinale du genre *Melissa*, possède particulièrement plusieurs propriétés thérapeutique très intéressantes a des propriétés stomachique, antispasmodique, cholérétique et calmante (**Sijelmassi, 2008**).

Toute fois notre travail a pour but de compléter les travaux qui ont été déjà fais par d'autres chercheurs (Feknous et al ,2012 ; Abdellatif et al .,2014) sur l'huile essentielle de *Mélissa officinalis L.*

Dans cette optique, dans le présent travail, nous nous assignés, les objectifs suivants :

- Identification les sites de stockage de l'huile essentielle de *Mélissa officinalis*.
- Analyse la composition chimique de l'Huile Essentielle de *Melissa officinalis* par la Technique de CG-MS.
- Etude du pouvoir antioxydant de *Melissa officinalis L.*
- Etude biologique portant sur l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne de cette plante vis-à-vis des souches microbiennes.

Matériel et Méthode

Notre étude expérimentale a été réalisée durant une période de cinq mois, et a eu lieu au niveau des structures suivantes :

- ✓ Etude des composés polaires et apolaires, les coupes histologiques de la plante *Melissa officinalis* au niveau du laboratoire de recherche (post-graduation) de Biologie végétale, du département de Biologie de l'université Blida 1.
- ✓ L'activité antimicrobienne a été réalisée au niveau du Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.
- ✓ L'activité antioxydant, par la méthode de réduction des radicaux libres DPPH, a été réalisée au niveau du laboratoire des Projets de Fin d'Etudes (PFE) département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1.
- ✓ La CGMS au niveau du laboratoire de Recherche de la Police Scientifique d'Alger.

II. Matériel & Méthodes :

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée selon les étapes suivantes ;

- **Récolte**

- Les parties aériennes (tige-feuille) de la plante (**Figure 5**) ont été récoltées dans la localité de Hammam Melouane, wilaya de Blida – Algérie, au mois d'avril 2015, avant la floraison.



Figure N°5 : *Melissa officinalis* L. (Original)

Matériel et Méthode

- **Techniques de séchage et broyage :**

Nous avons utilisé des échantillons à l'état frais pour l'étude botanique.

Le séchage de la plante a été effectué à l'abri de la lumière et de l'humidité, sur du papier (**Figure 6**), durant 15 jours.

Une partie du matériel végétal séché a été broyée à l'aide d'un moulin à café jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.



Figure N°6: Séchage de *Melissa officinalis* L. (Original, 2015)

II.1.2. Microorganismes

Les microorganismes utilisés dans l'activité antimicrobienne sont fournis par le laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida (**Tableau I**).

Tableau I: Souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Souches microbiennes		Référence
Bactérie Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Bactérie Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433

II.2 .Matériel non biologique:

Le matériel non biologique englobe toute la verrerie de laboratoire, milieux de culture, les réactifs chimiques et appareillage (**annexe 1**).

II .3. Etude botanique de la plante *Mélissa officinalis*(coupes histologiques) :

L'identification de la plante a été faite au niveau du Parc National de Chréa (Direction de Blida). 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 avec une double coloration au vert de méthyle et au rouge Congo.

Mode opératoire : Nous avons adopté la technique Universelle standard de la double coloration (rouge Congo, vert de méthyle) qui permet la coloration des tissus vivants en rouge et les tissus morts en vert (**Bensalem et bendjelleoul, 1998**).

Cette technique a été entamée par le trempage successif des coupes que l'on a récupérées selon les étapes suivantes :

- Mettre les coupes dans l'hypochlorite de sodium 10 à 15 min pour éliminer le contenu cellulaire.
- Rincer à l'eau pendant 10 à 20min.
- Ensuite, les mettre dans l'acide acétique pendant 1 min pour éliminer totalement l'eau de javel et assurer la fixation du colorant sur la paroi.
- Rincer, encore, avec de l'eau pendant 10 à 20 min.
- Mettre les coupes dans le vert de méthyle pendant 5 à 10min pour la coloration des parois lignifiées et / ou subérifiées.
- Rincer avec de l'eau pendant 10 à 20min.
- Et puis, les mettre dans le rouge Congo pendant 10 à 20min pour la coloration des parois pécocellulosiques.
- Et enfin, effectuer le dernier rinçage des coupes avec de l'eau.

Les meilleures coupes sont sélectionnées et mises entre lame et lamelle pour observation au microscope photonique.

II. 4. Etude Phytochimique de *Melissa officinalis* L

II.4.1. Etudes 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.

Trois méthodes d'extraction ont été utilisées:

- * Extraction solide - liquide
- * Extraction solide - liquide discontinue (macération).
- * Séparation liquide - liquide (décantation).

A. Etude des composés volatils

❖ Extraction de l'HE de mélisse par hydrodistillation

a) principe

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Telephon, 2008).

b) Mode opératoire

Pour l'hydrodistillation des plantes étudiées, nous avons utilisé un dispositif de type Clevenger (Figure 7).

Le matériel végétal séché (150g) est introduit dans un ballon de 2000 ml rempli d'eau au 2/3. Le tout est porté à ébullition pendant 4 heures.

La séparation HE-eau est faite par simple décantation.

c) Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (Caree, 1953).

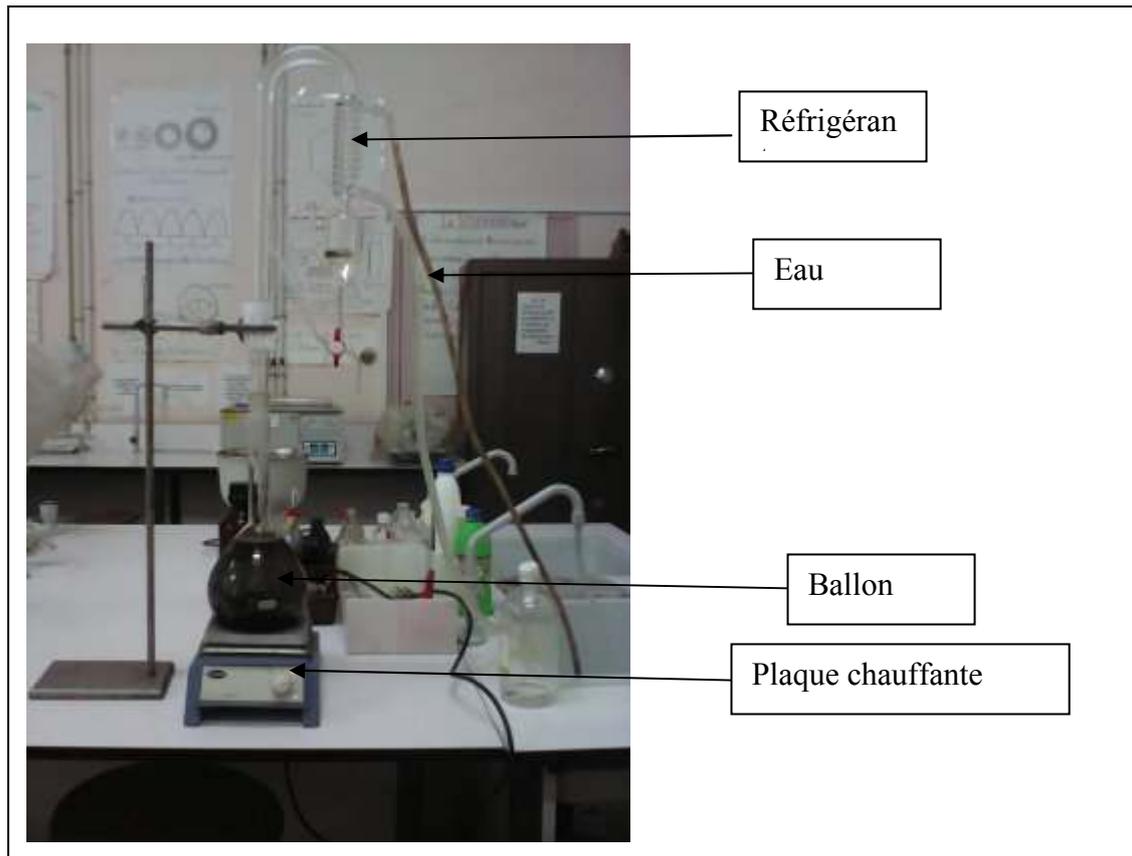
Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

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

R : Rendement de l'HE en %.

P_H: Poids de l'HE en g.

P_A: Poids de la plante traitée en g.



FigureN°7: Montage du dispositif Clevenger

➤ Contrôle Organoleptique de l'HE

Les propriétés organoleptique regroupant tout ce qui est perceptible par les sens ; ont été effectués par un personnel qualifié du laboratoire.

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

❖ **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 soumet l'échantillon à plusieurs tests, à savoir:

- Ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température;

Matériel et Méthode

- 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 (**Demeeck et Sablier,1997;Rouessac,2000**).

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 (**Hennebelle,2006**).

b) Conditions opératoires

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

Les conditions opératoires sont consignées dans le **tableau II**

Tableau II : Conditions opératoires de la CGMS

Méthode GC	Méthode MS
Volume injecté:1ul Température injecteur:250°C Colonne: Elite série 5-MS, 30m, 25mm ID, 0.25 um épaisseur de phase stationnaire Température initiale:70°C pendant 4min Rampe:4deg/min jusqu'à 220°C pendant 15min Temps d'analyse 56.5min	Mode d'ionisation : Impact électronique Energie:70ev Température : source 250°C Température ligne de transfert:250°C Analyseur : quadripôle Mode: balayage entre 20-550 daltons. Délai de solvant:5.9min
Logiciel utilisé: Le Scan.	

B. Etude des composés non volatils polaires et apolaires

❖ Extraction au soxhlet

a) Principe

L'extraction solide-liquide peut 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 (**Djabou et Sambucus, (2006), (Figure8)**).

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 (**Anonyme1**).

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 (**Houghton et Raman, 1998; Lagnika,2005**).

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 396 ml d'éther de pétrole dans un ballon et porté à ébullition après la réalisation du montage illustré par la (**figure8**).

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.

Matériel et Méthode

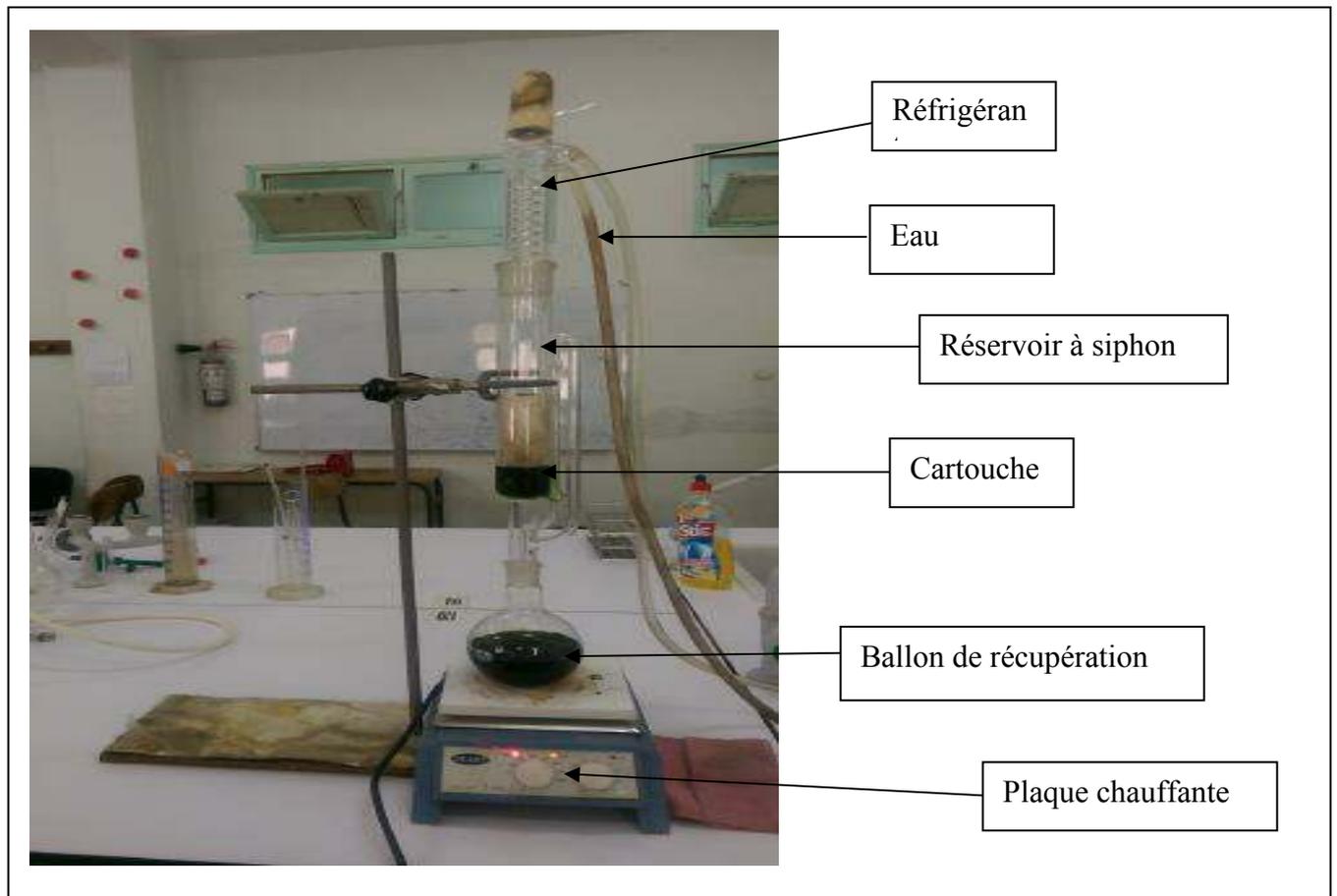


Figure N°8: Système d'extraction au soxhlet (Original,2015)

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 9**).

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

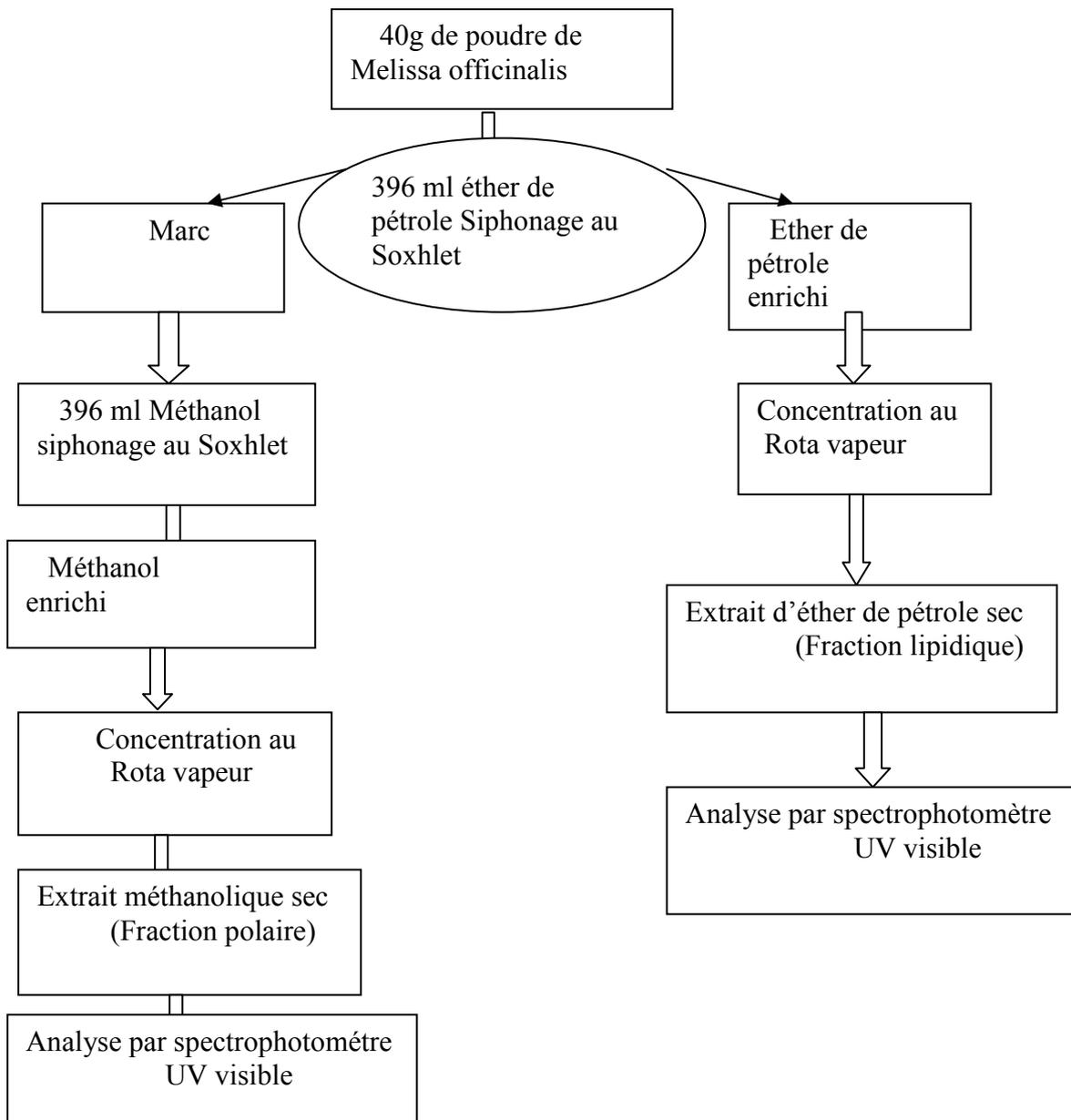


Figure N°9: Protocole expérimental de l'extraction des composés non volatils polaires et apolaires par Soxhlet.

❖ Analyse des fractions polaires et apolaires 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.

Matériel et Méthode

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(Lagnika ,2005).

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.

II.4.2.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 (Lagnika, 2005 ; Djabou et Sambucus nigra, 2006).

Nous avons effectué l'extraction des tanins et flavonoïdes de *Melissa officinalis* de la manière suivante :

❖ Extraction et détermination de la teneur en tanins

a)Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des tanins est illustré par la (Figure10).

Ainsi, 30 g de poudre végétale ont 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.

Matériel et Méthode

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 (**Bruneton, 1999**).

b) Détermination quantitative

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

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

$$m_t = P_2 - P_1$$

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

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

Matériel et Méthode

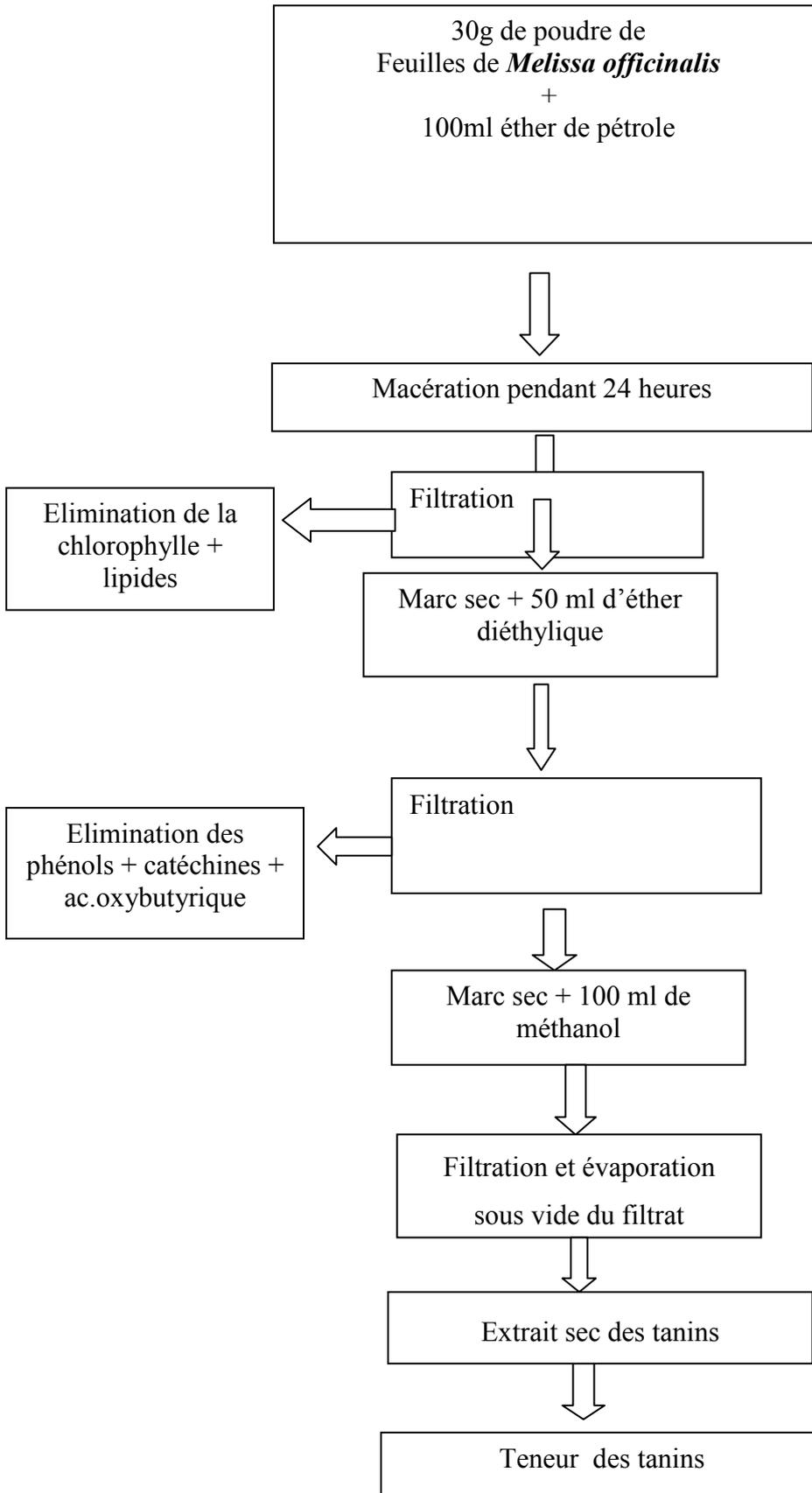


Figure N°10: Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des tanins.

❖ Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes :

a) Extraction

Le protocole expérimental suivi pour l'extraction des flavonoïdes est illustré par la (figure 11).

•Macération

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

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

Cette dernière phase contenant les flavonoïdes est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Elle est ensuite soumise à une évaporation du butanol sous vide à 55 °C pour l'obtention du résidu sec. C'est l'extrait des flavonoïdes qui sera pesé(Guignard, 2000).

b) Détermination quantitative

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

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

$$M_f = P_2 - P_1$$

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

Matériel et Méthode

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.

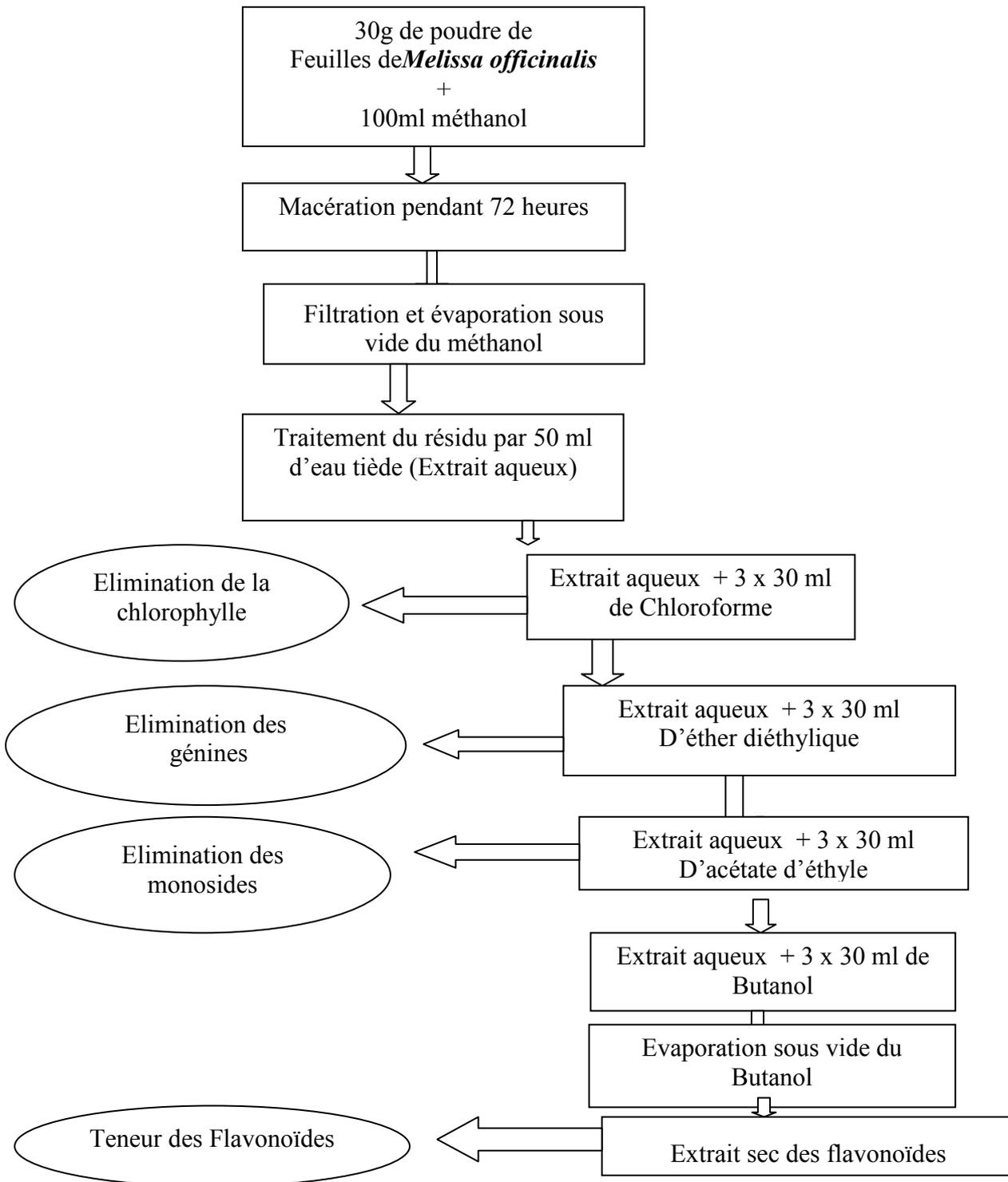


Figure N°11: Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des flavonoïdes

II.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.

Principe

Le DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr: 394.33) est un radical libre stable (**Figure 12**) en solution il donne une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle (**Chikhoun, 2007 ; Mohammedi, 2006**).



a: Diphenylpicrylhydrazyl

(Radical libre)

b: Diphenylpicrylhydrazine

(Non radicalaire)

Figure N°12: Forme libre et réduite du DPPH(Molyneux,2004) .

a) Mode opératoire

Le test utilisant le DPPH* a été réalisé en suivant la méthode décrite par (**Sanchez-Moreno et al.,1998 ; Hazzit, 2008**)

* 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 μ M de DPPH ce qui correspond approximativement à 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

Matériel et Méthode

* Préparation des solutions d'extraits

Pour tous les extraits, que ce soit la concrète polaire ou HE, 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 µl d'une concentration de l'échantillon à tester. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante de 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 µl de méthanol.

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 antioxydant 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.

II.4. Etude de l'activité antimicrobienne de *Melissa officinalis* :

Cette activité a pour but d'étudier qualitativement l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et l'hydrolat de *Melissa officinalis* par la méthode de diffusion sur milieu solide suivant les lignes directrices de NCCLS et les recommandations de l'OMS.

a) Principe

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire de l'extrait à tester sur un milieu solide afin de mettre en évidence l'effet antibactérien ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité des germes choisis vis-à-vis cet extrait.

- Des disques absorbants stériles de 9mm sont imprégnés d'une quantité de l'huile essentielle et l'hydrolat et déposés à la surface du milieu de cultureensemencé en surface d'une suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon stérile.
- L'incubation est faite dans une étuve à 37 pendant 24h, pour les bactéries et à 29 de 24 à 48h pour les levures.
- L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.
- Des boîtes de contrôle présentent des disques non imbibés par l'huile essentielle et l'hydrolat ainsi que d'autres boîtes témoins sans disque sontensemencées dans les conditions de l'expérience, nous renseignent sur l'homogénéité du tapis bactérien.

b) Mode opératoire selon la méthode de Rahal, (2005)

Toute l'expérimentation a été réalisée devant un bec benzène

L'activité antimicrobienne a été testée avec :

- L'huile essentielle de *Melissa officinalis*
- L'hydrolat
- Le Ciprofloxacine, Métronidazol et l'AmphetericineB(témoins positifs).
- Faire fondre les milieux Muller-Hinton(MH) et Sabouraud (SAB) dans un bain marie à 95 °C puis les faire couler dans les boîtes de Pétri de 90mm de diamètre, laisser refroidir sur la pailasse.
- Préparer l'inoculum : à partir d'une culture jeune, de 18h pour les bactéries et de 48h pour les levures, des suspensions troubles ont été réalisées en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques et les déposer dans 5 ml d'eau physiologique stérile en agitant très bien(l'inoculum doit être utilisé suivant sa préparation).

Matériel et Méthode

- Dans la zone stérile, ensemencer les souches microbiennes, en suspension, à l'aide des écouvillons dans les boîtes de Pétri contenant les géloses (MH pour les bactéries et SAB pour les levures)
- A l'aide d'une pince stérile, on met en contact les disques stériles avec les différents échantillons cités auparavant, dont les solutions vont être absorbés progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Déposer les disques sur la surface de gélose: on a déposé deux(02) disques l'un imbibé dans l'huile essentielle et l'autre dans l'hydrolat dans une seule boîte(**figure13**).
- Incuber à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 29 °C de 24 à48h pour les Levures.

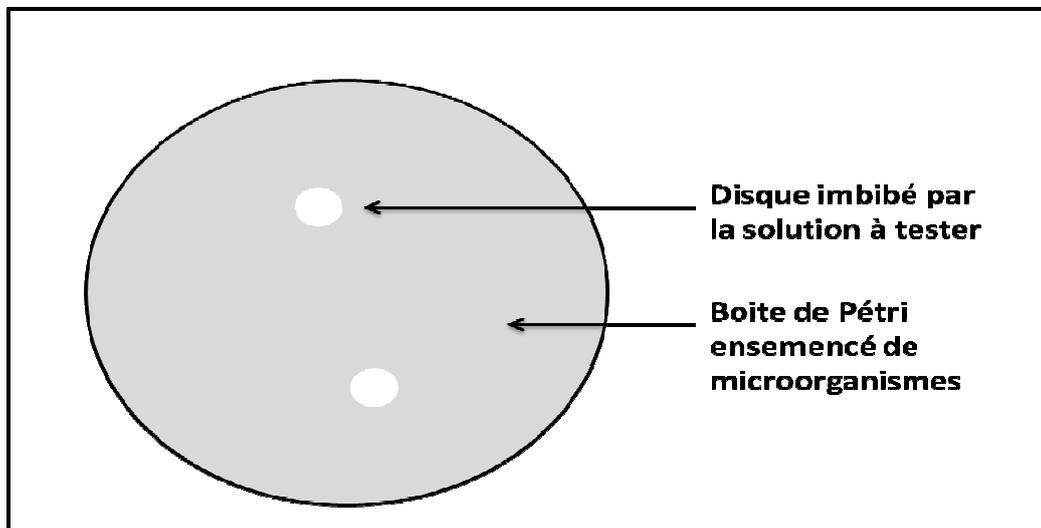


Figure N°13 :Position des disques dans la boîte de Pétri

- **Expression des résultats**

La mesure du diamètre des halos d'inhibition (**figure14**) est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**Tableau III**).

Matériel et Méthode

Tableau III: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Mutai et al ., 2009)

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

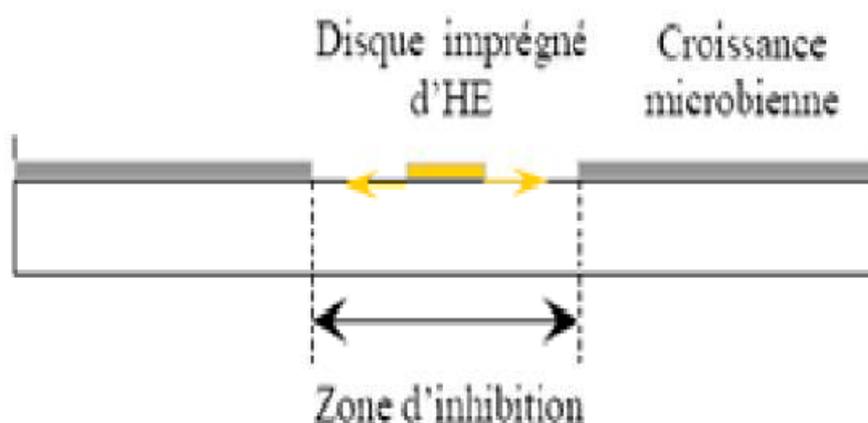


Figure N°14 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes(Chikhoun, 2007).

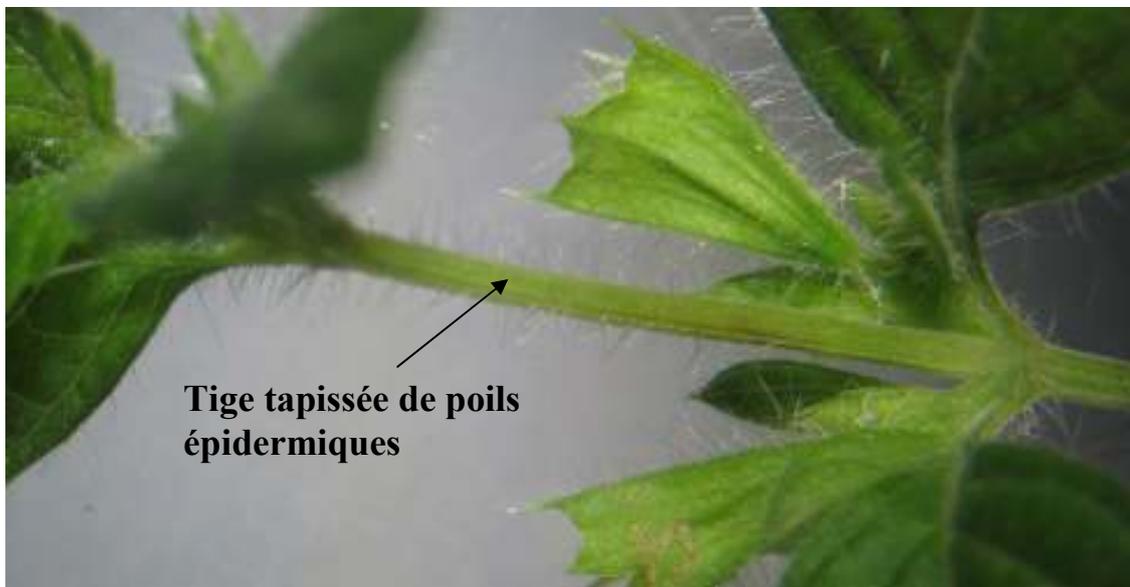
III.1. Résultats de l'étude botanique de la plante

III.1.1. Etude macroscopique

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

III.1.1.1. La tige

Elle est quadrangulaire et mesure 60 à 80 cm de longueur. Elle apparait tapissée à la loupe binoculaire, de poils épidermiques (**Figure 15**).



Tige tapissée de poils épidermiques

Figure N°15: Vue d'une partie de la tige à la loupe Gx 2.5 (originale)

III.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 16, a, b**).



Face supérieure Gx 2.5 (a)

Face inférieure Gx 2.5 (b)

Figure N°16: Vue d'une feuille (faces supérieure et inférieure) à la loupe binoculaire (originale)

L'aspect macroscopique de *Melissa officinalis* L. a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermiques sur la tige et les feuilles.

III.1.2. Etude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices, nous avons effectué des coupes histologiques à main levée sur la tige et la feuille.

III.1.2.1. La tige

Dans la coupe transversale de la tige (**figures 17, 18,19**), on observe de l'extérieur vers l'intérieur :

- Une cuticule
- Le collenchyme angulaire
- La moelle ou parenchyme médullaire.
- Sclérenchyme
- Poil tecteur
- Poils sécréteurs à tête vésiculaire

Résultats et Discussions

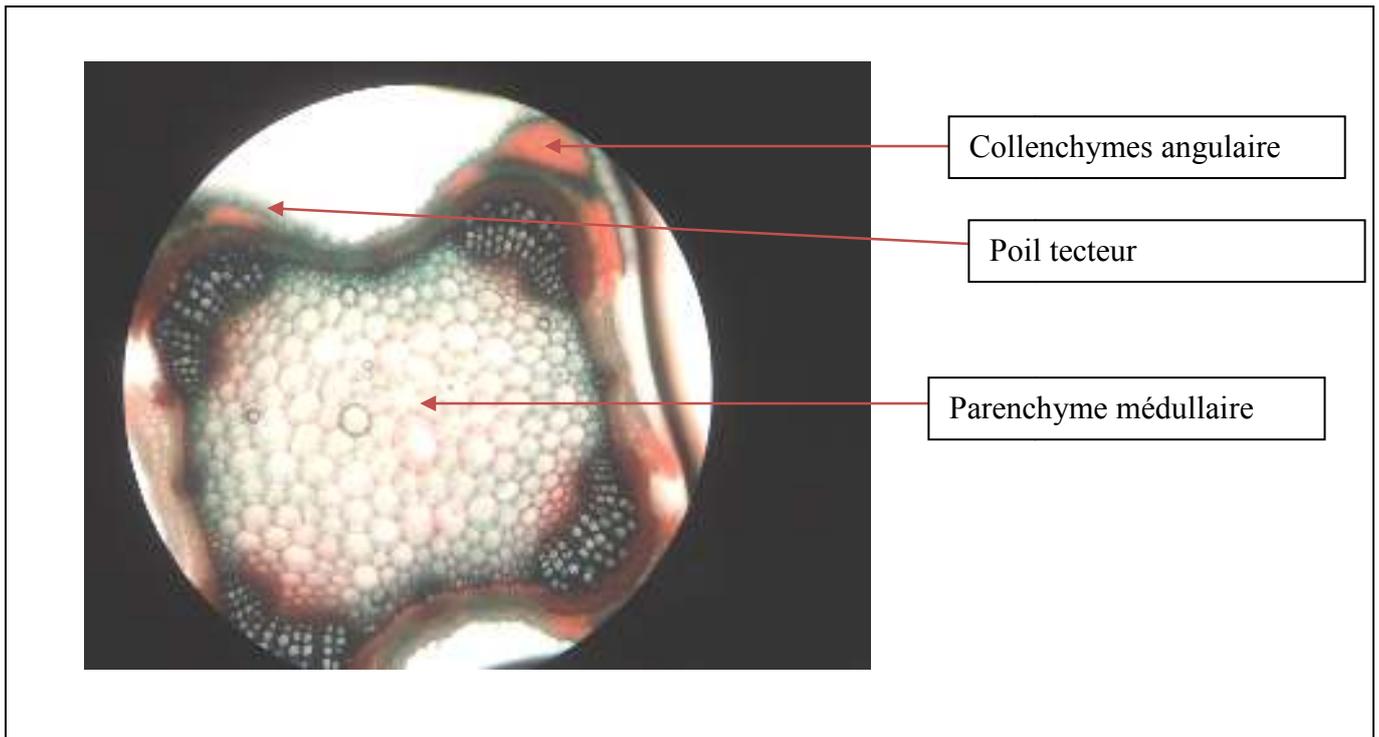


Figure N°17: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 10 (originale)

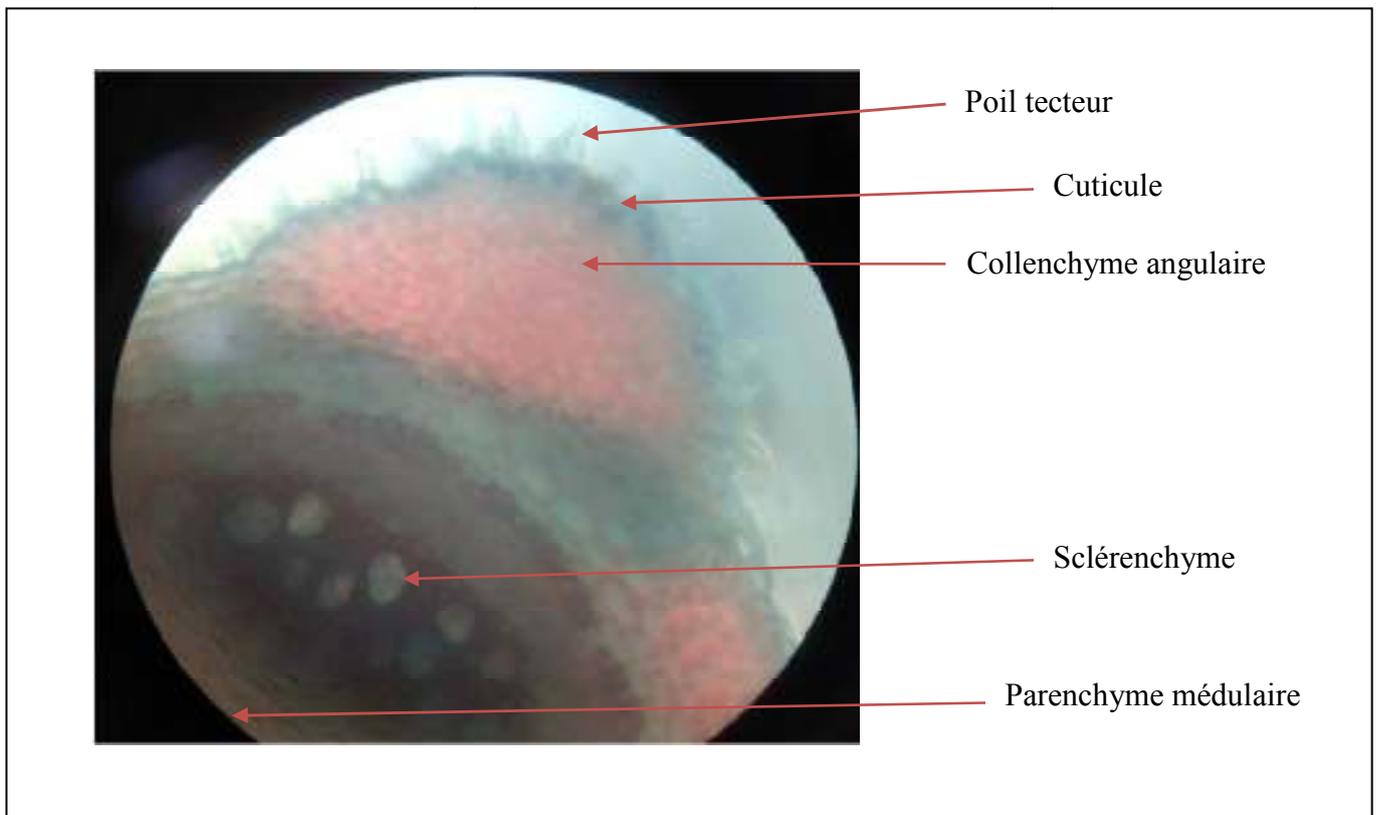


Figure N°18: Coupe transversale au niveau de la tige Gx 40 (originale)

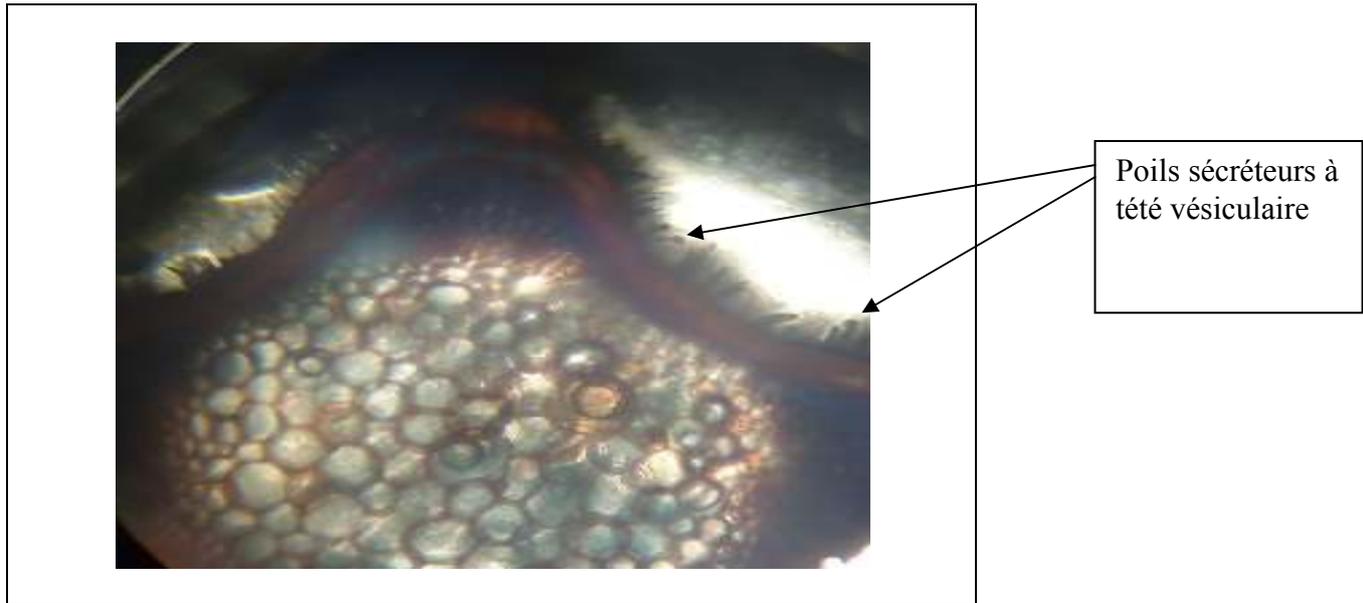


Figure N°19 : Observation microscopique des poils au niveau de la tige de *Melissa officinalis* Gx10

III.1.2.2. La feuille

Les feuilles sont tapissées de poils épidermiques. Leur observation au microscope photonique précise leur structure pluricellulaire (Figures 20, 21,22).

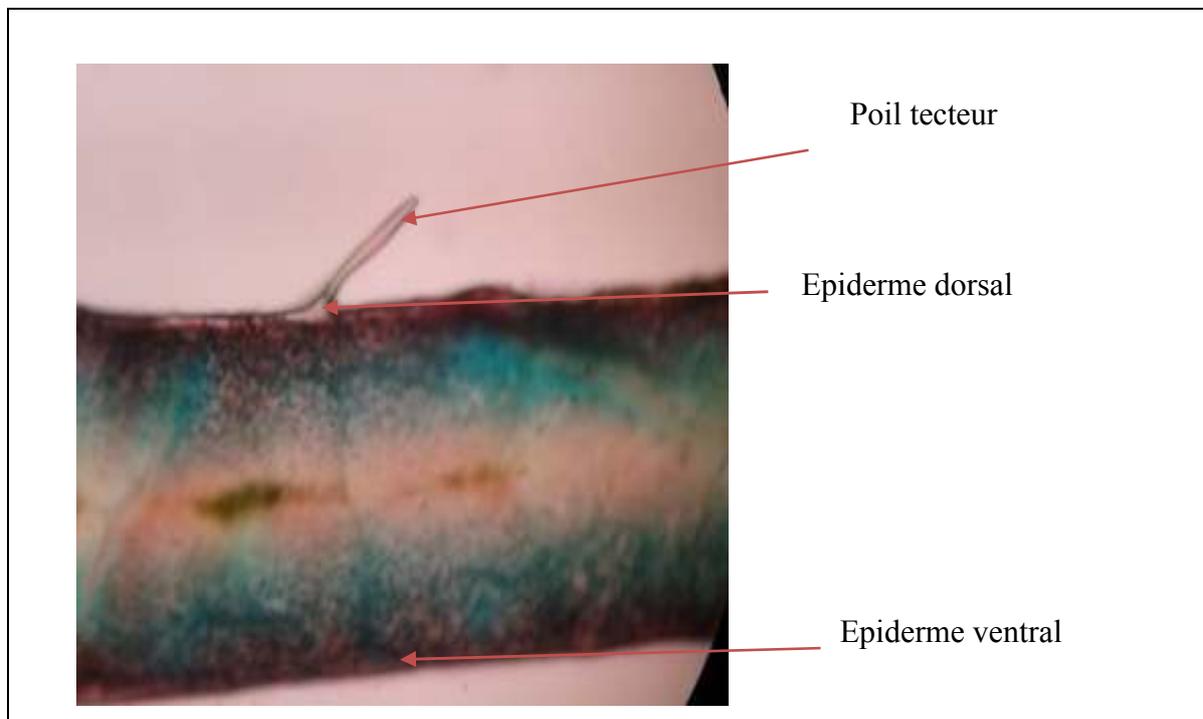


Figure N°20: Coupe transversale au niveau de la feuille Gx 10 (originale)

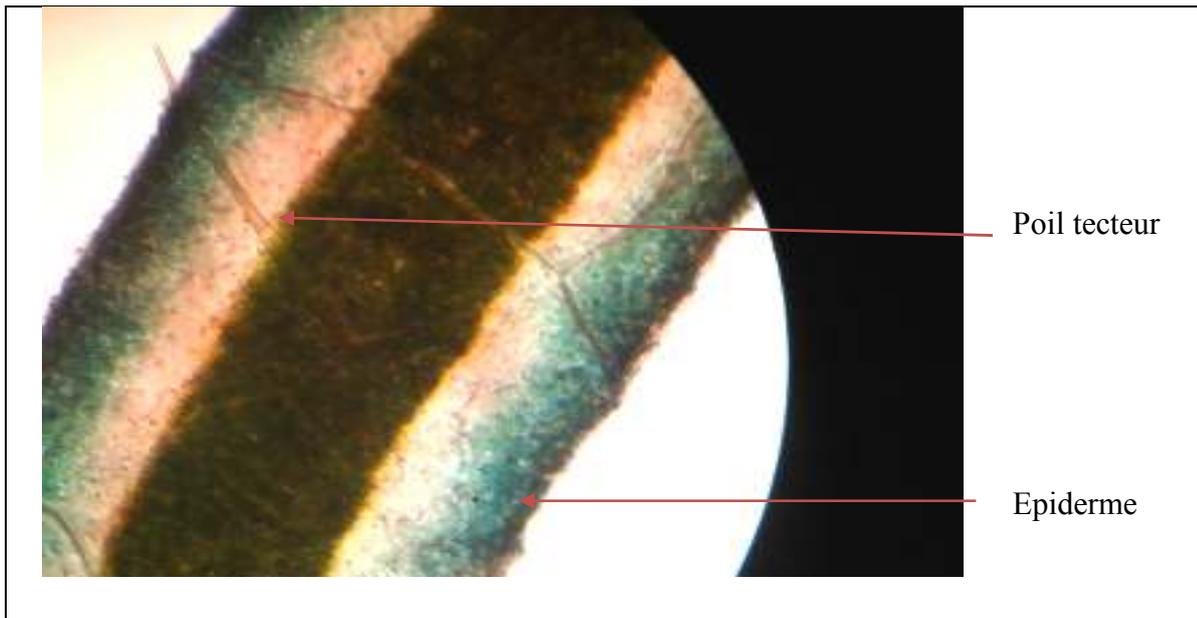


Figure N°21: Coupe transversale au niveau de la feuille Gx 40 (originale)

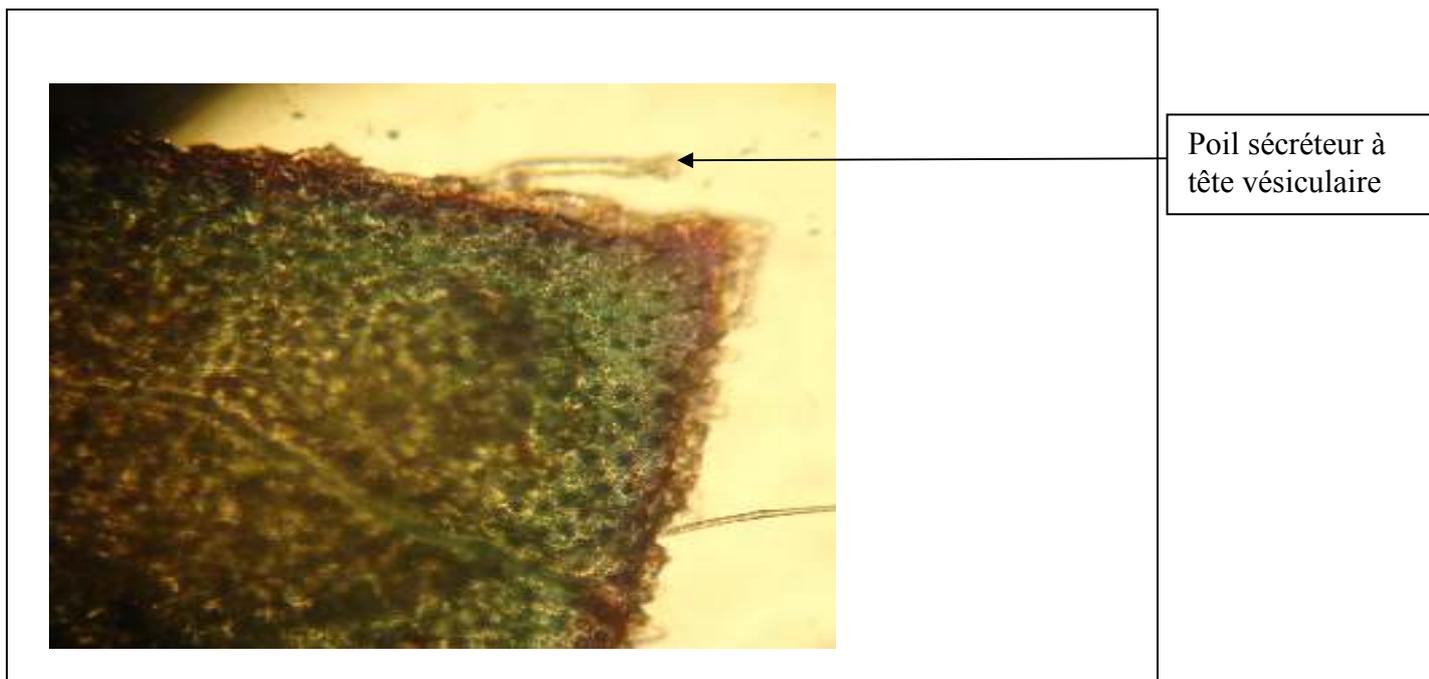


Figure N°22 : Poils épidermiques au niveau de la feuille de *Mélisse officinalis* Gx10

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

D'après Feknous (2012), Les poils épidermiques à tête vésiculaire sont responsables de la sécrétion de l'HE.

Les plantes de la famille des lamiacée sont caractérisées par les poils sécréteurs. onles trouve dans le romarain le basilic (Botteg et Corsi ,2000; Marin et al., 2006).

Résultats et Discussions

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

III.2. Etude phytochimique de *Melissa officinalis* L.

III.2.1. Etude des principes actifs de *Melissa officinalis* L

A. Etude des composés volatils

❖ Extraction et rendement en huile essentielle.

L'huile essentielle extraite à partir des organes aériens de la plante séchée à été obtenue par hydrodistillation. Le Rendement est représenté dans le **tableau IV**.

Tableau IV: Résultats du rendement

Poids de la plante (moyenne en g)	Poids de l'HE (moyenne en g)	Rendement (%)
1039.375	1.6630	0.16

Le rendement moyen en HE est de 0,16 %. D'après Teustcher et al. (2005), la teneur en HE de la mélisse varie de 0,05 à 0,3%.

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

Tableau V: Caractéristiques organoleptiques de l'HE

	Aspect	Couleur	Odeur
HE de <i>Melissa officinalis</i>	Liquide	Jaune foncée	Très forte, citronnée et très agréable.
Anonyme, 2008	Liquide. Limpide ; mobile	jaune	Citronnée caractéristique

Après extraction nous avons obtenue une huile essentielle liquide de couleur jaune avec une odeur très fortes citronnée très agréable ; ses caractéristiques sont conforme à ceux donnés par Anonyme, (2008) c'est un paramètre qui indique la bonne qualité de notre huile essentielle.

❖ Composition chimique d'huile essentielle

L'analyse de l'HE de *Melissa officinalis* par CGMS, nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la **Figure N°23** et (**Annexe II**).

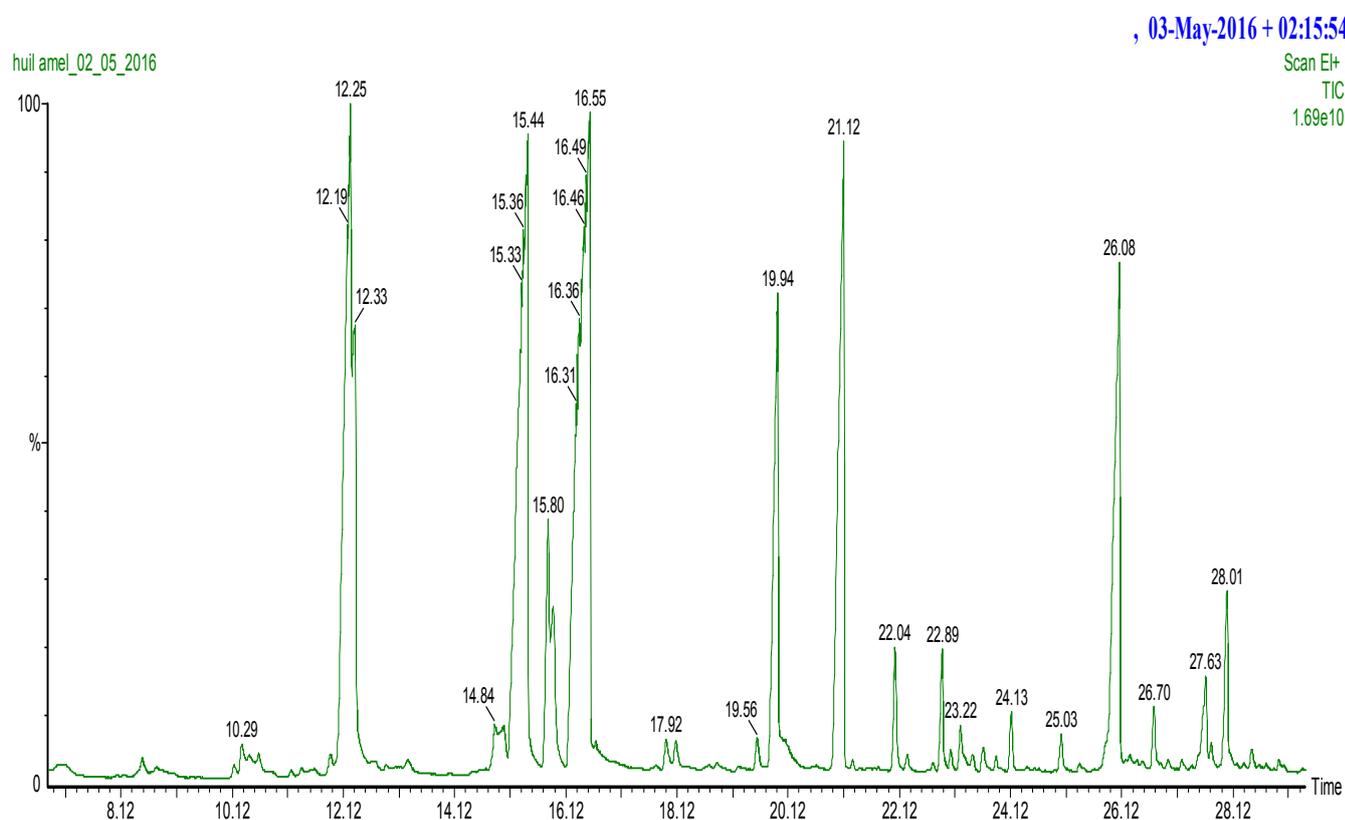


Figure N°23: Chromatogramme de l'HE extraite par hydrodistillation et analysée par la CG-MS (originale, 2016).

L'analyse des huiles essentielles de la partie aérienne nous a permis l'identification de 09 composée (**Annexe II**), sont présentées dans le tableau et les figures suivantes :

Résultats et Discussions

Tableau VI : Les composéés présents dans l'huile essentielle de la mélisse

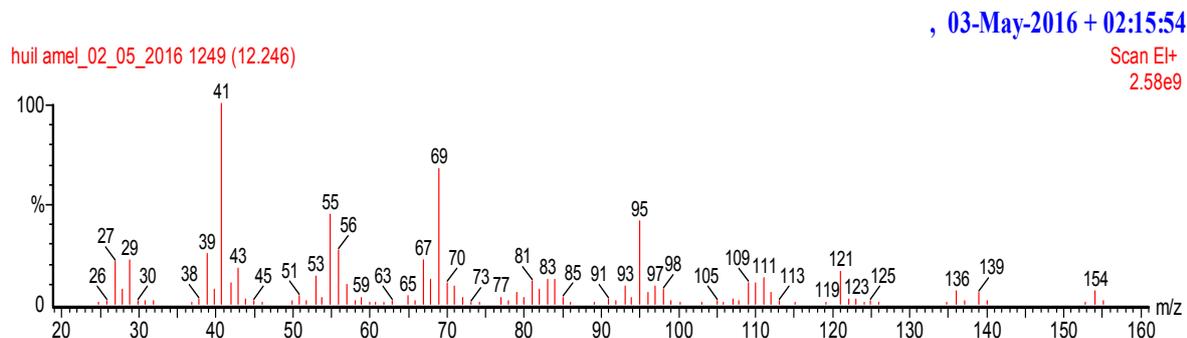
Temp de retention(min)	Composée	Catégorie	La teneur en %
12.25	Citronellal	Aldéhyde monoterpènes	16.83
15.44	(Z)-Citral	Aldéhyde monoterpènes	15.48
16.55	(E)-Citral	Aldéhyde monoterpènes	16.16
19.94	Acétate de neryl	Ester monoterpènes	11.78
21.12	(trans) -β caryophyllène	Hydrocarbure Sesquiterpènes	15.48
22.04	Humulene	Hydrocarbure Sesquiterpènes	3.36
22.89	Beta-Copaene	sesquiterpènes	3.36
26.00	Germacrène (D)	Hydrocarbure Sesquiterpènes	12.45
28.01	Beta-Cadinol	Sesquiterpènes	5.05

Le chromatogramme (**Figure N°23**) issu de l'analyse de l'huile essentielle de *Melissa officinalis L.* comporte six pics nécessaires chaque pic a été soumis à une analyse par spectrométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

Résultats et Discussions

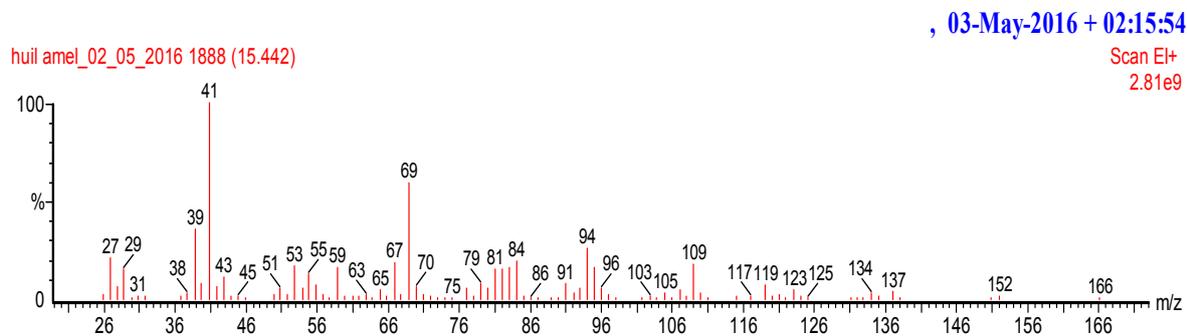
Le pic n° 1, correspond au spectre de masse du Citronellal (Figure N° 24) qui est un monoterpène avec un teneur de 16.83%.

TR=12.25



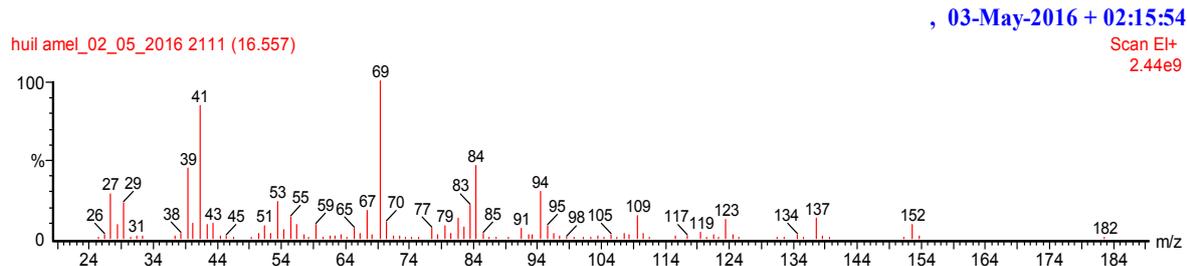
Le pic n° 2 correspond au spectre de masse du Z-Citral (Figure N° 25) qui appartient à la famille des monoterpène avec un teneur de 15.48%.

TR=15.44



Le pic n° 3 correspond au spectre de masse du (E)-Citral (Figure N° 26) appartenant à la famille des monoterpènes avec un teneur de 16.16%.

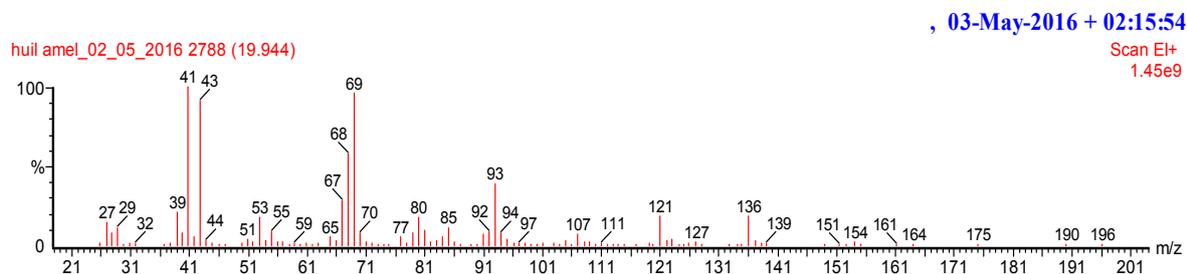
TR=16.55



Résultats et Discussions

Le pic n° 4 correspond au spectre de masse de l'Acétate de Neryl (Figure N° 27) qui est un ester monoterpène avec un teneur de 11.78%.

TR=19.94



FigureN°27: Spectre de messe de Acetate de Neryl (Originale, 2016)

Le pic n° 5 correspond au spectre de masse du Trans (Beta) caryophyllène (Figure N° 28) qui est un sesquiterpènes avec n teneur de 15.48%.

TR=21.12

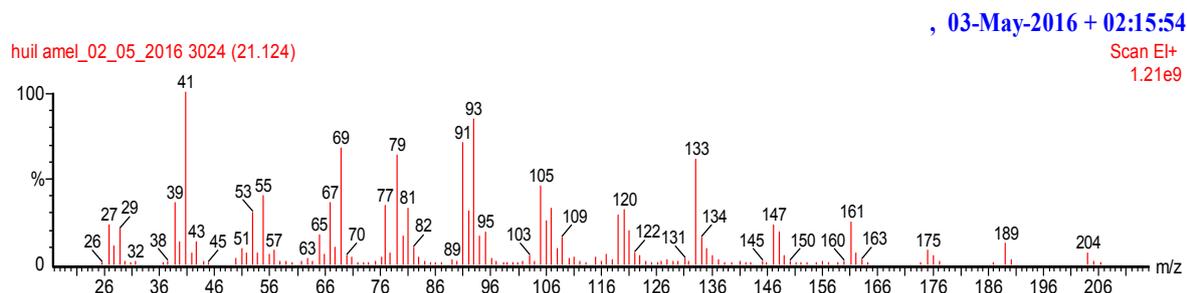


Figure N°28 : Spectre de messe de Trans (Beta) caryophyllène (Originale, 2016)

Le pic n° 6 correspond au spectre de masse du **Germacrène D** (Figure N° 29) appartenant à la famille des sésquiterpène avec un teneur de 12.45%.

TR=26.08

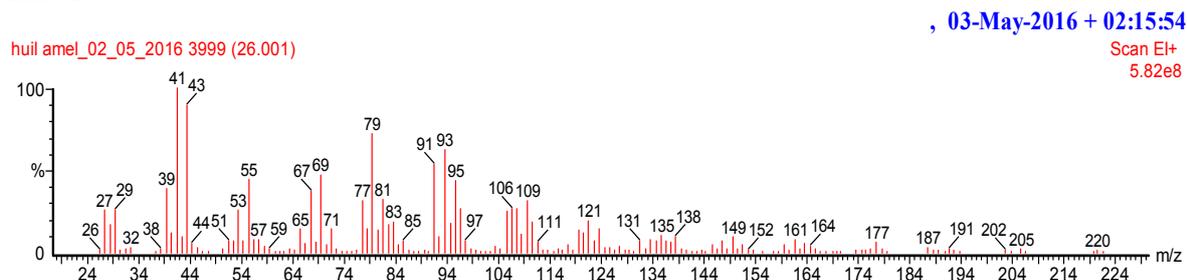


Figure N°29 : Spectre de messe du Germacrène D (Originale, 2016)

Résultats et Discussions

D'après nos résultats, l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. elle est composée majoritairement par Citronellal, Germacrène (D), (trans) β caryophyllène, Acétate de Neryl, (E)- Citral, (Z)-Citral.

Selon les résultats obtenus par (Feknous et al ,2012) l'huile essentielle de la mélisse récolter à blida et composée majoritairement par néral ou citral b, bergamotene, l'acétate de citronellyl, l'oxyde de caryophyllene. D'autre part, l'essence volatile d'Alger possède du géraniol, néral et le citronellal (Abdellatif et al,2014). Ces constituants majoritaires qui caractérisent cette HE peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres notamment les condition de stockage ainsi l'équipement et le mode d'extraction.

On constate que l'huile essentielle de *Melissa officinalis* est principalement composée par des aldéhydes monoterpénique et des sesquiterpènes.

De plus une attention a été accordée au rôle pharmaceutique et médicinal de l'aldéhyde monoterpénique et des sesquiterpènes.

Pour les aldéhydes monoterpénique (le citral et le citronellal) ils sont responsables de l'odeur caractéristique de citron (Wichti et Anton ,2003) et ont de multiples action pharmacologique, ils peuvent être anti inflammatoire, anti viral, sédatif.

Les hydrocarbures sesquiterpénique peuvent avoir une action anti inflammatoire et anti histaminique (Roux, 2008).

B) Etude des composés non volatils apolaires et polaires.

➤ 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 VII.

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

	Poids de la poudre (moyenne en g)	Poids de la concrète (moyenne en g)	Pourcentage (%)
Composés apolaires	40	3.90	9.75
Composés polaires		9	22.5

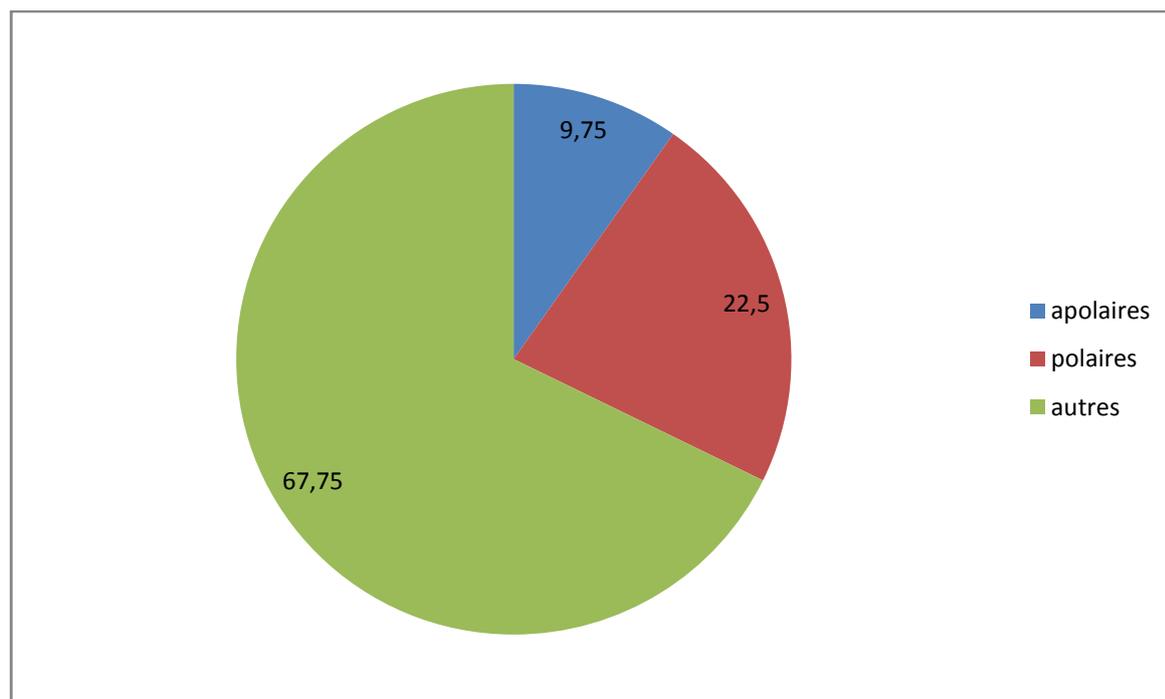


Figure N°30: Teneur en composés apolaires et polaires de *Melissa officinalis* L.

La figure 30, montre que la teneur en substances non volatiles est de 67,75% du poids de la poudre de la plante. Les composés apolaires représentent 09,75 % et les composés polaires représentent 22,5 % du poids de la poudre de la plante.

D'après nos résultats, la mélisse, à travers les différents solvants d'extraction polaire (méthanol) et apolaire (éther de pétrol), contiennent une proportion importante en produit polaire, avec un coefficient de 3 par apport à l'éther de pétrol comme solvant apolaire.

Selon les résultats obtenus par (Feknous et al ,2012) 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.

On constate que le solvant polaire extrait tout les composé polaire comme (les alcaloïdes, glucides, flavonoïdes, tanin, phénol, polyphénol, chlorophylle, caroténoïdes) par contre l'éther de pétrol est sélectif pour les lipides et les colorant comme β -carotène.

❖ Analyse des fractions par spectrophotométrie 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 31 et 32.

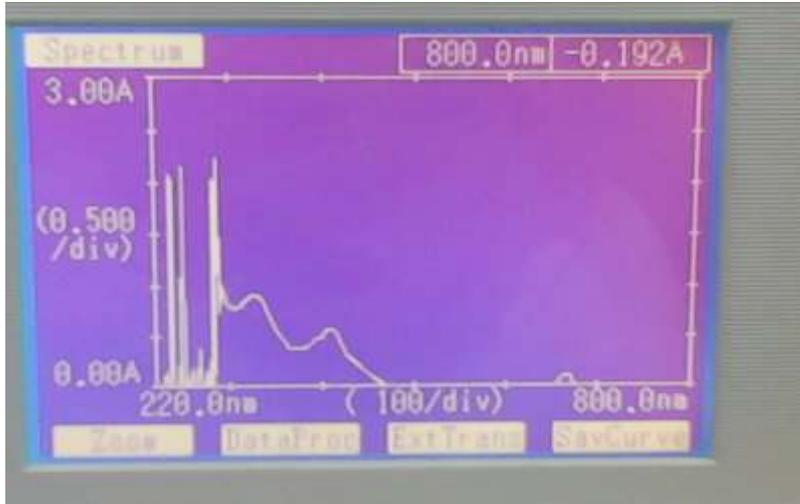


Figure N°31: Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de *Melissa officinalis* L. (originale)

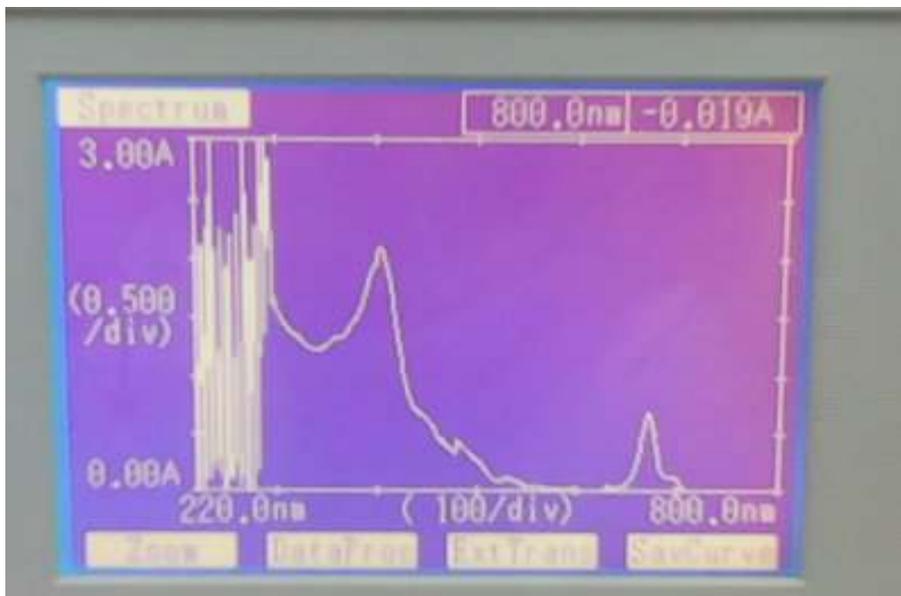


Figure N°32: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L. (originale)

Dans les Figures 31 et 32 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.

Résultats et Discussions

Selon LAFONT (2005), 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.

Le spectre UV –visible a obtenu après extraction par l'éther de pétrole de la *Melisse officinalis* permis de distingué la présence de deux pic, le 1^{er} pic située environ 300 nm est spécifique au triglycéride insaturé. Cependant la 2^{ème} pic localisée a 400nm est spécifique au produit colorée en jaune orange, caractérisée de β –carotène. par contre le spectre UV-visible obtenu après extraction par méthanol permis de mettre en évidence la présence de deux pic, le 1^{er}pic située à 400nm spécifique au β –carotène, tandis que le 2^{ème} Pic situé a 700nm est caractérisée de chlorophylle.

On constat que l'absorbance pour chaque fraction elle est confirmée l'efficacité de l'extraction.

III.2.2. Extraction de certains principes actifs de *Melissa officinalis* L

➤ Résultats de l'extraction des tanins

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

Tableau VIII: Résultats de la teneur en tanins

Prisse d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Tanins (% / g du poids sec)
30	1 .36	4.53

➤ Résultats de l'extraction des flavonoïdes

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

Tableau IX : Résultats de la teneur en flavonoïdes

Prisse d'essai (g)	Poids de l'extrait (g)	Teneur en Flavonoïdes (% / g du poids sec)
30	0.1300	0.4333

Résultats et Discussions

D'après nos résultats, la *Melisse officinalice* contient un pourcentage importante en tanin exprime en pourcentage par apport au poids sec de la mélisse 4.53%. Comparativement la teneur en flavonoïde est largement faible elle est de l'ordre 0.43%.

Selon (**charpentier et al, 1998**) les tanins donnant à cette plante les différentes propriétés thérapeutiques.

Selon Teuscher, la teneur en flavonoïdes est comprise entre 0,2 % et 0,7 % chez la mélisse.

D'après (Naghibi, et al 2005) qui, mentionné que la plante *Teucrium polium geyricume* espèce des lamiacées de la région de Tamanrasset, est riche en diverse métabolites dot les flavonoïdes et les tanins, la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante, en effet, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composée phénolique.

Des études récentes ont montré que les facteurs géographiques et climatiques, les facteurs génétiques, le degré de nutrition de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénol (**Bouzi, 2009**).

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

III. 3. Etude de l'Activité antioxydante de l'Huile essentielle de *Melissa officinalis*

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.

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 et 2 en Appendice III.

III.3.1. Résultat de l'absorbance du DPPH :

Nous remarquons que l'absorbance à 517nm du DPPH dans l'extrait méthanolique de *M.officinalis*. Diminuée progressivement en fonction de concentration. (Figures33).

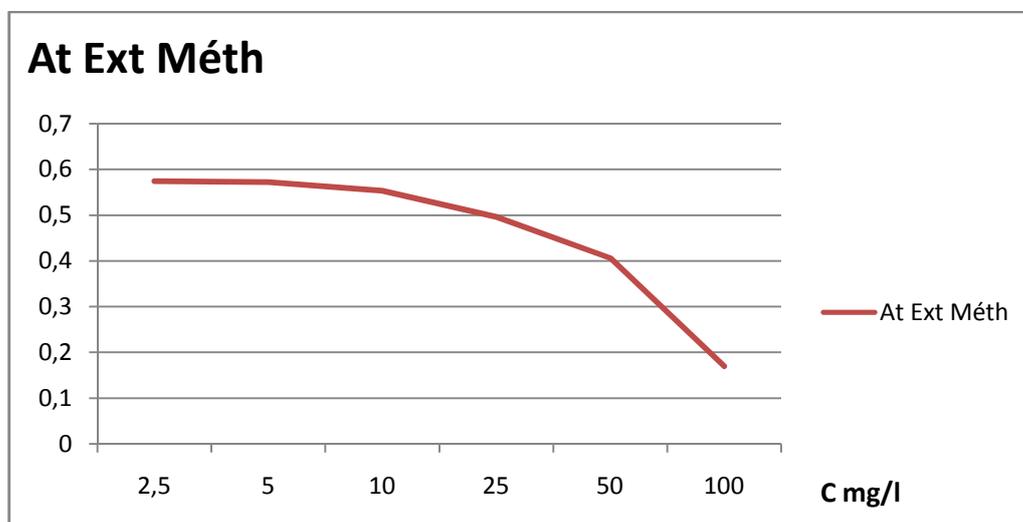


Figure N°33: Evolution de l'absorbance de l'extrait méthanolique testés en fonction de différentes concentrations.

Nous remarquons que l'absorbance à 517nm du DPPH dans l'huile essentielle de *M.officinalis*. Décroît d'une manière graduelle, Dé que la concentration élevée l'absorbance va diminuée (Figures34).

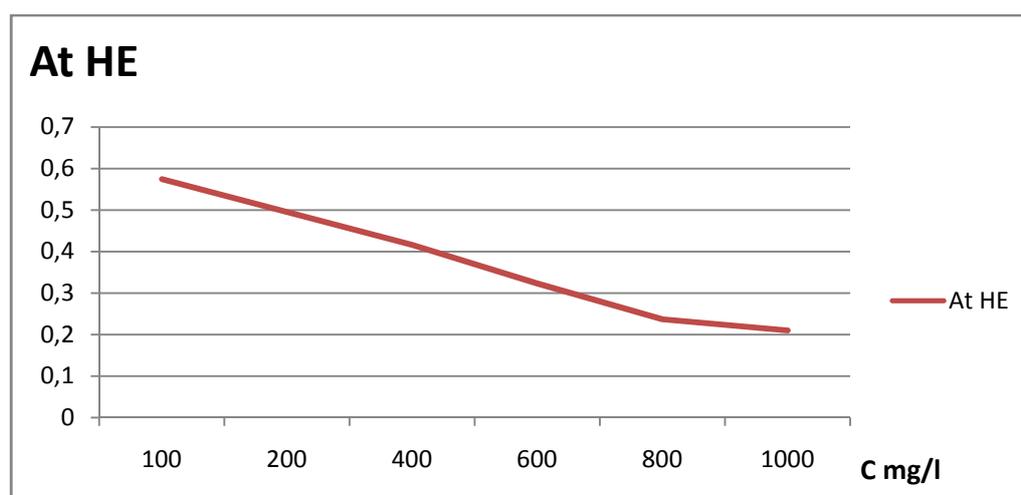


Figure N°34: Evolution de l'absorbance de l'huile essentielle testée en fonction de différentes concentrations.

III.3.2. Evolution de l'inhibition radicalaire :

Le profil de l'activité anti radicalaire de chaque substance testée vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans les figures 35 et 36.

La figure 31 montre que l'extrait méthanolique atteint une inhibition maximale respectivement de 75%. Cette inhibition augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique.

La figure 32 montre que L'huile essentielle atteint une inhibition maximale de 67%. Cette inhibition augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle. En effet, l'inhibition radicalaire n'est pas totale car, elle est de 67% à une forte concentration (1000 mg/l) en HE.

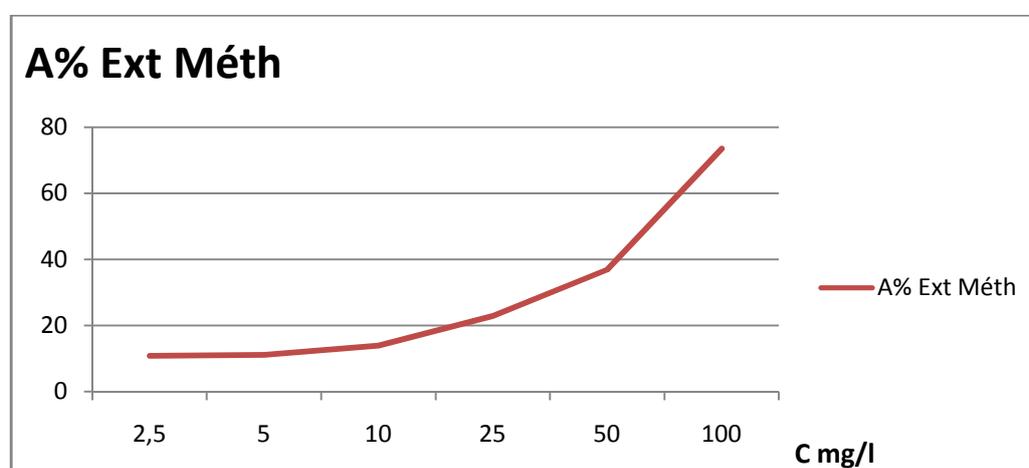


Figure N°35: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire de l'extrait méthanolique testés en fonction de différentes concentrations.

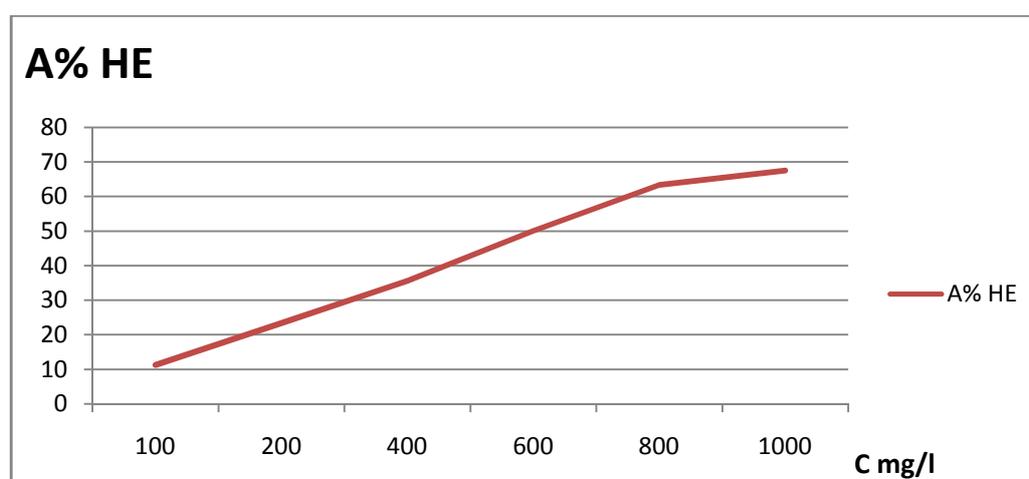


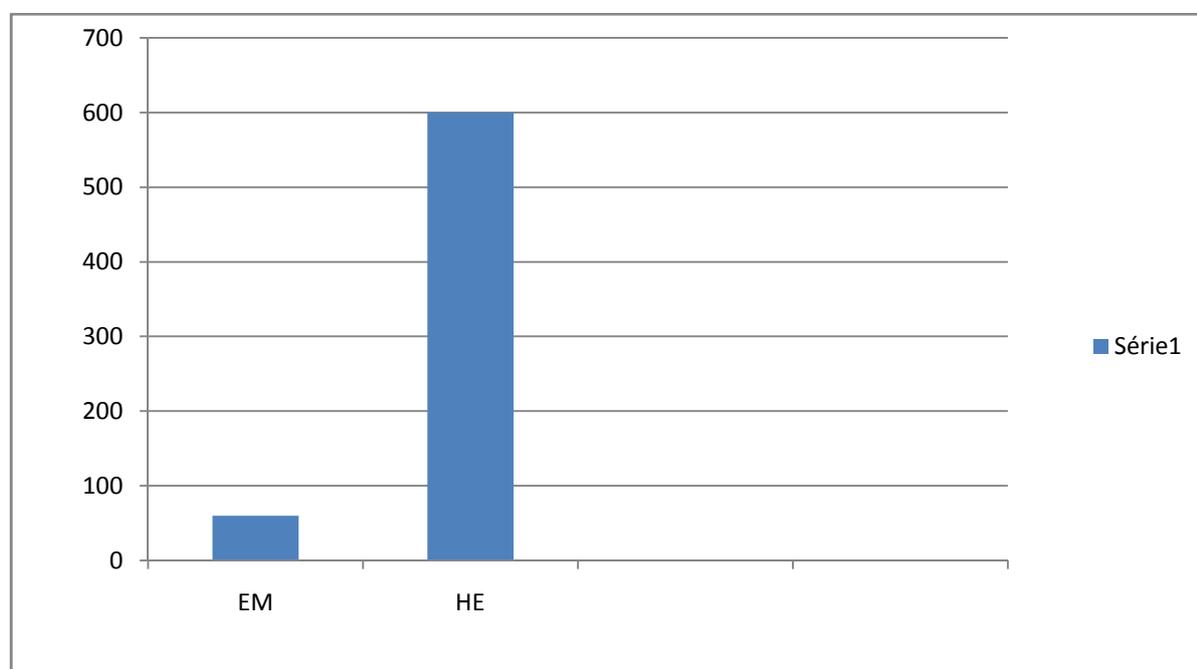
Figure N°36: Evolution du pourcentage de l'inhibition radicalaire des échantillons testés en fonction de différentes concentrations.

III.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 37.

Ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité du DPPH (couleur) (Molyneux, 2004).

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%.



FigureN°37: Classement croissant des substances testées selon leur EC50.

Comme représenté dans la figure24, les EC50 l'extrait méthanolique et de l'Huile Essentielle est égal à 60 et mg/l 600 mg/l respectivement.

Nous pouvons dire que l'extrait méthanolique de la mélisse présente une forte activité anti oxydante par rapport à celle de l'Huile Essentielle

D'après Feknous et *al*, (2012) l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes. Ce dernier est un excellent antioxydant naturel. Au contraire l'activité anti oxydant de Huile de la mélisse est très faible car elle est riche en composés phénoliques.

Résultats et Discussions

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.

III. 4. Etude de l'Activité antimicrobienne de l'Huile essentielle de *Melissa officinalis*

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat de la mélisse a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé sur trois souches bactériennes et une levure. (Annexe IV)

Les résultats de ce screening antimicrobien sont rapportés dans les tableaux X-XI

Tableau X: Résultat de l'activité anti microbienne de l'huile essentielle de *Mélissa officinalis*.

Souche	Diamètre de la zone en mm	Intèrprétation
<i>Escherichia coli</i>	16	Inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	Inhibition
<i>Candida albicans</i>	45	Inhibition

Tableau VI : Résultat de l'activité anti microbienne de l'hydrolat de *Mélissa officinalis*.

Souche	Diamètre de la zone en mm	Intèrprétation
<i>Escherichia coli</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	Pas d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	25	Inhibition

Résultats et Discussions

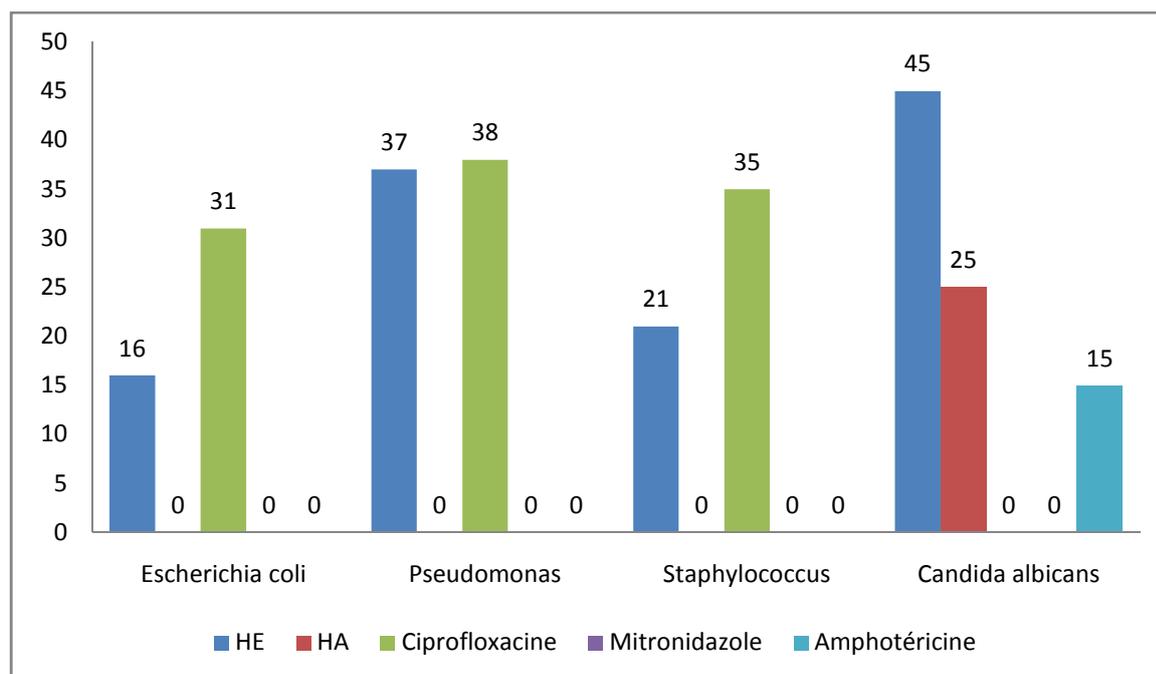


Figure N°38: Résultat de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et l'hydrolat de *Mélissa officinalis*.

D'après les Tableaux 09-10 et la (Figure 38) :

Les résultats que nous avons obtenu, nous avons remarqué la présence de zones d'inhibition importantes pour les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ainsi que pour *Candida albicans*. Ce résultat montre l'efficacité de l'HE de la mélisse dans l'inhibition de la croissance de ces germes microbiens.

Nous avons observé que l'HE de la mélisse agit fortement sur *Candida albicans* (45mm) alors que les antibiotiques de référence Ciprofloxacin et métronidazol n'ont pas d'effet sur ce germe. par contre une zone moyenne d'inhibition de (15mm) a été obtenue sous l'action de Amphotéricine B. mais qui demeure toujours inférieure à celle de l'HE

Concernant le pouvoir antimicrobien de l'hydrolat nous avons remarqué l'absence de zone d'inhibition pour les souches *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. par conséquent, l'hydrolat de la Mélisse n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance de ces germes.

En revanche, nous signalons la présence de zone (25mm) pour la souche *Candida albicans*. Ce qui démontre l'efficacité de l'hydrolat de la mélisse sur l'inhibition de la croissance de cette levure, Alors que le antifongiques Amphotéricine B ont montré une inhibition légèrement inférieure (15mm) a celle de l'HA.

Résultats et Discussions

On remarque que les souches bactérienne étudiées en l'occurrence *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* se montrent sensible vis-à-vis l'antibiotique ciprofloxacine, la levure *Candida albicans* se révèle sensible a l'AmphotéricineB.

Les huiles essentielles des lamiacée sont connes pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes (**Hayon, 2007**).

Une étude a permis de mettre en évidence une activité bactériostatique de l'HE de *Melissa officinalis* vis-à-vis de plusieurs bactérie : *Pseudomonas aeruginosa*, *Putida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas sp*, (**Larrondo et al.,1995**).

Dans une étude réalisée en 2005, l'activité antibactérienne de l'HE de *Melissa officinalis* a été étudiée contre plusieurs bactéries et levures dont : *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les principaux constituants de l'HE obtenue par distillations a la vapeur, était géraniol (17.30%), néral (14.70%), citronellal (10.70%). L'étude à montré que l'HE de *Melissa officinalis* a une activité anti bactérienne importante. (**Anicic et al.,2005**).

On peut conclure que l'HE de *Melissa officinalis* possède une activité antibactérienne importante sur les souches que nous avons étudiée *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida*.

Conclusion

Cette étude a pour but de déterminer le pouvoir antimicrobien et antioxydant d'une plante médicinale connue sous le nom de citronnelle (*Melissa officinalis*), à travers la détermination de certaines propriétés biologiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'observation des coupes histologiques, les coupes réalisées ont révélés l'absence de cellules et des poches sécrétrices ou de canaux excréteurs.

L'extraction de l'essence aromatique de la plante a été accomplie par la méthode d'hydrodistillation, le rendement de l'HE a atteint 0.16%, dont les propriétés organoleptiques sont 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 de révéler que l'extrait volatil de la plante est composé essentiellement par des aldéhydes monoterpéniques et des sesquiterpènes.

L'étude phytochimique des composés non volatils par des procédés d'extraction tel que le soxhlet permis de quantifier une teneur de 9.75% des composés apolaires, 22.5% des composés polaires ,4.53% de tanins et 0.43% des flavonoïdes.

Par ailleurs, l'étude du pouvoir antioxydant testé par la méthode de DPPH a montré que l'huile essentielle de la mélisse a une faible activité antioxydante, par contre l'extrait méthanolique présente une forte activité anti oxydante.

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* L.,a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis du *candida albicans*(45mm),*Pseudomonas aeruginosa*(37mm) *Staphylococcus aureus*(21mm), et *Echerichia coli*(16mm),par contre l'hydrolat elle a un effet inhibiteur sur *Candida albicans* (25mm) mais qui demeure toujours inférieure à celle de l'huile essentielle.

En aromathérapie, l'emploi des huiles essentielles aromatiques, en particulier celles de *Melissa* est à recommander car ses molécules terpéniques apparaissent comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique.

Comme perspective et en vue de poursuivre et approfondir nos connaissances sur cette plante à parfum, notamment l'aspect phytothérapeutique, il serait intéressant de :

Conclusion

- Déterminer une éventuelle activité antimicrobienne de l'HE avec d'autres souches bactériennes
- Evaluer la toxicité de l'huile essentielle in vivo
- Evaluation des différentes activités biologiques telles que l'activité antispasmodique

Références bibliographiques

A

Abdellatif F., Boudjella H, Zitouni A, Hassani A.,(2014): »Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. »Excli journal 2014;13772-781-ISSN 1611-2156 Received: June 28.2014,accepted:July 09,2014,published:July 17,2014.

Ait Youssef M., 2006 : « Plantes médicinales de Kabylie » ;Edition Ibis Press,Paris,P 349.

Anicic NV, Dimitrijevic S, Ristic MS, Petrovic SS, Petrovic SD.,(2005) Antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* Lamiaceae Hemyska industria,2005 (VOL,59)(NO9/10)243-247.

Anonyme., (2008): Laboratoire Florame Aromathérapie Huile essentielle de la mélisse lot 8859.

Andreas,B.,(1998): »Guide des plantes du bassin méditerranéen »,édition Française, Les éditions Eugen Ulmer,400p.

Anton R. et Wichtl M., (2003) : Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, Science et thérapeutique. Cachan : 2ème éd: *TEC & DOC*, 503 p.et692p.

APG II.,(2009)I: Tela botanica MELISSA OFFICINALIS E Flor, La flore électronique de Tela botanica BDTFXV.3.00.

B

Baba Aissa F.,(2011).Encyclopédie des plantes utiles, flore méditerranéenne (Maghreb, Europe méridional) substances végétales d’Afrique, d’orient et d’occident. Edition el maarifa, Alger.p221-471.

Baba Aissa F.,(1999)« Encyclopédie des plantes utiles, flores d’Algérie et du Maghreb »,copyright librairie, Alger ,368p.

BABULKA P., (2005) - *La mélisse (Melissa officinalis L.)* - Phytothérapie, 3 - p. 114-117.

Beloued, A., (09-2005) « plantes médicinales d’Algérie », Edition Office de publications universitaires, 284p.

Bensalem, M et Bendjelleoul, D.,(1998) Technique histologique :théorie et pratique, office des publication Universitaires (OPU),Alger, p56-57.

BONNIER G.,(1990) La Grande Flor en couleurs de Gaston Bonnier. Edition BELIN, Tome 4,892, 208-909

Références bibliographiques

Bottega S. and Corsi G.,(2000):”Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L.”.Botanical J.Li(09-2005) nnean Soc.123:325-335.

Boullard,B.,(2001): 3Dictionnaire/Plantes médicinales du monde récolte et croyance » Edition ESTEM.

Bouزيد A,Yahia M.,(2009) Décomposition des effets de la libéralisation financière :Crises verus croissance,Tunisie .11-12PP

Bruneton J., (1993): »Pharmacognosie Phytochimie, plantes médicinales ».2^{ème}Edition . Tec& Doc.Lavoisier . Paris P1120.

Brunton,J., (1999): » pharmacognosie,phytochimie,plantes médicinales »,Tec et doc édition Lavoisier, paris,3^{ème} édition, p1120.

C

Caree, P.,(1953) « »précis de technologie et de chimie industrielle », Edition Ballière JB et fils, Tome 3, p170.

Charpentier, B., Hamon-Lorléac'H, F., Harlay, A., Huard, A. et Ridoux, L.,(1998) »Guide du préparation en pharmacie », Edition Masson, Paris, p1242.

Chikhoun, A.,(2007) “ Huiles essentielles de thym et d'origan”, Thèse de magister en agronomie, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, p168.

D

Delile L.(2007) « Les plantes médicinales en Algérie », édition : Berti. Alger, p240.

Delil L., (2013) : « Les plantes médicinales d'Algérie »,3^{me} Edition Berti,P168 .

Delaveau P., Lorrain M., Mortier F., Rivolier C., Rivolier J., Schweitzer R.,(1989) Secrets et vertus des plantes médicinales 2^o édition, Sélection du Reader's digest.

De maak, F. et Sablier, M.,(1997) “ Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse”, Techniques de l'ingénieur - Traité, Analyse et Caractérisation, pp 2614.

Djabou, N., “*Sambucus nigra* L., (2006) 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, 123p.

Références bibliographiques

E

Elabed, D. et Kambouche, N., (2003): « Leshuilles essentielles », Editions Dar El Gharb, p91.

El-Rhaffari L., Zaid A. ; 2004. «Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet)». Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée » Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes,pp. 293-318.

F

Feknous S.,Saidi F,Mouhamed Said,2012:Extraction,caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs d'une plantes à caractère thérapeutique, *Melissa officinalis L.*

Fintelmann V et Weiss R.F. (2003). Manuel pratique de phytothérapie. Edit : Vigot, Maloine, 438p, pp : 2.

G

Goyet C.,2013 : « Guide de poche de phytothérapie »,Edition Quotidien Malin,P 15.

Grünwald J et Janick C., (2004). Guide de la phytothérapie. Edit : Marabout, pp : 24

Grunwald J., Janick C., (2006) guide de la phytothérapie, la thérapeutique par les plantes /santé par les plantes un répertoire des plantes des conseils pratiques, édition Marabout, pages 25, 29, 31,53.

Guignard, J-L.,(2000) « Biochimie végétale », Editions Masson, Paris, 2^{ème} édition, 281p.

H

Hamza N.,2011 « Effet préventif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabete de type 2 expérimental induit par le régime-high fatchezles souris C57BL/6J » These Doctorat.Science alimentaire.Constantine,p16.

Hayon.J.,(2007) : Les plantes qui nous soignent ,tradition et thérapeutique ,Ed Ouest France,22-23.

Hazzit, M., (2008) “ Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie”, Thèse de doctorat en chimie, Faculté de chimie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, 130p

Références bibliographiques

Hennebelle, T., (2006) “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, 304p

Houghton, P. J. and Raman A., (1998) “Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts”, Edition Chapman et Hall, 1ère éd., Londres, pp 29-31.

I

Iserin N.,(1997) : Encyclopédie des plantes médicinales (identification, préparation, soins).Larousse-Borda, 335P.PP :145-29.

Iserin P.,Biaujeaud M .,Bloth J.,Botrel A.,De Laage de meus A., De la Roque R.,De La Roque O.,Deelesalle-Feat T.,Masson M.,Moulard F.,Restellini J P.,Ringuet J.,Vican P.,Ybert E. et Zha E.,2001 « Larousse Encyclopédie des plantes médicinales »
EditionaLarousse Paris. Pp10-17,132p.

L

Lacoste S., (2012) : Ma bile des trucs de santé, Edition DUC.S, p161.

Lafont, R., (2005) “ Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ”, "<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html> "

Lagnika, L., (2005) “Etude phytochimique et activité biologique des substances naturelles isolées de plantes Béninoises”, Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, université Louis Pasteur Strasbourg, 268p.

Larrondo JV ,Agut M ,Calvo-torras MA.,(1995) Antimicrobial activity of essences from labiates Microbiose.1995 ;82(332à);171-2 .

M

Magnami P.,1979 : « Culture et cueillette des plantes médicinales »,Edition Hachette,127 P.

Références bibliographiques

Marin M.,Koko V.,Duletic-LausevicS.,Marin P.D.,Rancic D.et Dajictevanovic Z.,(2006):”Glandlar trichomes on the leaves of Rosmarinus officinalis:Morphology,stereology and histo chemistry”.S.African J.Botany.72:378-382.

Martinetti P.,(2013): «Mon guide des huiles Essentielle », Edition Lanore,P 150,151.

Massésué M.,1975 : « Mon herbie de santé »Edition Robert Laffont.

Mohammedi, Z.,(2006)“ 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, 105p.

Molyneux, P.,(2004)“The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrqyl - DPPH for estimating antioxidant activity”, Sci. technol, pp 211-219.

Muti C;Bii .C;Vagias C;Abatis D et Roussis V,2009 “Antimiccobial activity of acacia mellifera extract=s and lupine triterpenes”journal of Ethno pharmacology,pp 10-1016.

N

Naghibi F, M Mosoddegh, S,Mohamadi&, A,Agharbani,(2005):labiatae family in flok Medicine in Irans from Ethnobotany to pharmacology.Iranian Journal of pharmaceutical Research 2:63.79pp

O

OMS. (2003). Organisation Mondiale de la Santé de cinquante-sixième assemblée Mondiale de la santé à 56/18, «médecine traditionnelle», pp : 1-5.

P

Perrot E. et Paris R. (1971) - *Les plantes médicinales - Tome 2* - France : Presses Universitaires de France - p117.

Pierre M ., Lys M.,2007 : « Secret des plantes »,Edition LANOR,P 36.

Pousset J. I. (1989). Plantes médicinales Africaines : utilisation pratique. Paris.

Références bibliographiques

Q

Quezel et Santa.,(1963) « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales ». Centre national des recherches scientifiques, p1165.

R

Rahal K.,(2005).Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS,4^{ème}ED ,Ministre de la santé,de la population et de la Réforme Hospitalière.

Rouessac, F.,(2000) « Analyse chimique – Méthodes et technique instrumentales modernes », Edition Dunod, 5^{ème} édition, p219.

Roux D.,(2005): »Les nouvelles plantes qui soignent »Alpen Edition,p92.

Roux D.,(2008): »Conseil en Aromathérapie » 2ieme Edition,Edition pro officina,187p.

S

Sanchez-Moreno,C., Lurrari, J-A. And Saura-Calixo, F.A.,(1998) “Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols”, J. Sci. Food Agric.,pp 76, 270-276.

Schauenberg P. et Paris, F., (1977) : Guide des plantes médicinales-Analyse description et utilisation de 400 plantes. 3ème édition Delachaux et Niestlé S.A.,Neuchâtel Switzerland ,.Paris,. 396 p.

Sijilmassi A.,2008 : »Les plantes médicinales du maroc »,Edition le fennec Casablanca, P285.

T

Teuscher.E, Antor.R, Lobstein.A .,(2005) : plantes aromatiques : Epices, Aromates ,condiments et huiles essentielles .Edition Tec&Doc (300-303).522p.

Thoby C.,(2009) - *La mélisse officinale, Melissa officinalis L.* - Thèse d'exercice : Pharmacie, Université de Nantes, n°18 - 136 p.

Thurzova .L ,Sabrier.D ,Devroye.C ,Symones.M ,Fasbender.B .,(1985): »Les plantes-santé qui poussent autour de nous .Bruxelle .Elsevier Squoi, pp7-236,268.

Références bibliographiques

V

Volak, J. et Stodola, J., (1983) « »plante médicinales », Grund, Paris, p298.

W

Wichtl M. et Anton R., (2003) - Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique - 2ème édition - Paris : Editions Tec&Doc - p691.

Z

Zehir et Baudoux D.,(2005) «aromathérapie scientifique, Huiles essentielles chémotyées et leurs synergies ».Edition INSPIR développement, Luxembourg, p43.

Zeghad N., (2009). Etude de contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leurs activité antibactérienne. Thèse de Magister en Biologie, Université Mentouri de Constantine, 84p.