



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département de BIOLOGIE



Laboratoire :
Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

MÉMOIRE

Présenté par

M^{elle} HAMDAOUI Kamila
M^{elle} ADJDIR Souhila

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En sciences biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante
des extraits de *Mélissa officinalis***

Soutenu le 15 Juin 2023 devant le jury composé de :

Président	AZZI Rachid	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	RAHMOUN Mohammed Nadjib	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	BELAID-MEDJDOUB Houria	Maitre de conférences B	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir accordé la force, la volonté, la patience et la santé jusqu'à ce que nous accomplissions ce modeste travail.

Tout d'abord, nous adressons nos sincères remerciements à notre honorable encadrant **M^r RAHMOUN Mohammed Nadjib**, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, d'avoir accepté de diriger ce travail avec plaisir, respect, soutien et confiance. Vous avez toujours été un enseignant solidaire et compréhensif, et votre place est toujours grande dans nos cœurs. Merci effectivement pour votre présence.

Nous voudrions remercier particulièrement **M^r AZZI Rachid**, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, pour son aide et réponse au niveau de laboratoire. Merci également d'avoir accepté de présider ce jury.

Nous tenons à remercier **M^{me} BELAID-MEDJDOUB Houria**, Maître de conférences B, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons nos plus chaleureux remerciements à **M^{elle} MEZOUAR Dounia**, maître de conférence A, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, d'avoir été à nos côtés et de nous soutenir dans la pratique. Merci énormément. Nous remercions également **M^r AISSAOUI Mohammed**, enseignant, Département de Sciences de la Nature et de la vie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Tamanrasset, pour sa présence et ses conseils.

Nous voudrions également dire un mot de remerciement à **Mme BENARIBA Nabila**, la responsable de notre promotion Biochimie appliquée, et à **tous nos professeurs** durant notre cursus universitaire, en particulier **M^r BETTIOUI Reda**, **M^{me} BRIKCI NIGASSA Amel...**

Nous remercions autant **Fatima, Fayza et Abd el Salam** doctorants (e) à l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour leurs supports. Nous n'oublions pas de remercier **toutes l'équipe du laboratoire LAPSAB**, particulièrement **Rachida et Fouziya**, et tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin pour le succès de ce travail.

Dédicaces

Du fond de mon cœur, je veux dédier ce modeste travail à :

Ma maman, mon amour, tu es mon âme, ma vie et le souffle que je prends, tu es tout ce qui est précieux pour moi. Quoi que je dise, je ne peux pas accomplir tes efforts et tes sacrifices pour moi et ma sœur. J'espère que tu acceptes ce simple succès qui est le mien, et qu'il sera une raison de votre fierté pour moi, et assurez- toi que ce n'est que le début. Il y a encore un long chemin à parcourir dans lequel vous seriez témoin de mes succès. Je t'aime maman.

Mon papa, le roi de ma vie, alors que j'écris ces mots, mon cœur se brise. J'aurais aimé que tu sois à mes côtés dans ce moment, j'aurais aimé voir ta joie et ta fierté en moi, mais le destin de Dieu était plus fort que nous. Je dédie ce modeste travail à ton âme et je te promets d'élever ton nom au plus haut. Repose-toi en paix.



Ma grande sœur Imene, malgré toutes les querelles qui se produisent entre nous, tu restes mon adorable sœur et ma compagne de vie. Merci de votre présence.

Ma grand-mère et mes chères tantes Rabia, Fatna et Cherifa merci de m'avoir soutenu au fil des ans, ainsi que mes oncles Lakhdar, Mohammed et également Abd el Ali. Vous êtes les plus chers à mon cœur.

Toutes la Famille Adjdir en particulier mon oncle Abd el krime, mohammed et également mon cher oncle Radouane. Dieu accorde la paix à son âme.



Mes chères copines, la vie est douce avec votre présence Kamila, Assia, Zahra, wafaa Abir, Amira, Manel, mon frère Amine. Ainsi que toutes mes collègues de la promo master 2 Biochimie appliquée.

Souhila

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, je dédie ce modeste travail à :

A ma chère mère, à la lumière de ma vie, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, à la meilleure femme qui est toujours présente, qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il doit.

A mon cher père, à l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui a su se montrer patient, compréhensif et qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

Que Dieu les protège et que ce travail soit la preuve modeste d'un profond amour pour eux.



A mes précieuses sœurs : Wissem et Ratiba et mes chers frères Khalil et Yasser

A mon grand-père maternel bien-aimé, que Dieu lui fasse miséricorde.

Mes grands-mères maternelle et paternelle, à mon grand-père paternel, que Dieu les garde.

Mes chères tantes et mes chers oncles.

Toute la famille HAMDAOUI et LACHGUEUR



A ma meilleure amie et sœur BELGHIT Wafaa, merci énormément pour ta présence à mon côté, tes conseils et ton encouragement.

A mes chers ami (e)s : Souhila, Manel, Amine, Imrane, mohamed, Imene, Sihem, Sonia et toute la promotion de Biochimie appliquée

A tous les membres du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Kamila

Table de matière

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie bibliographique

Chapitre I : le stress oxydant

1. Les radicaux libres	4
1.1. Classes des radicaux libres	4
1.2. Principales sources des radicaux libres	4
1.2.1 Origine endogène	4
1.2.2 Origine exogène	5
2. Le stress oxydatif	5
2.1. Les marques biologiques de stress oxydatif.....	5
2.2. Implication du stress oxydant dans les pathologies	6
3. Les Antioxydants	7
3.1. Antioxydants enzymatiques (endogènes)	7
3.2. Antioxydants non enzymatiques (exogènes)	7

Chapitre II : Phytothérapie et les plantes médicinales

1. La phytothérapie	10
2. Les plantes médicinales	10
3. Métabolite primaire	10
4. Métabolite secondaire	10
5. Classification des métabolites secondaires	11
5.1. Les composés phénoliques	11
5.1.1. Les acides phénoliques	11
5.1.2. Les flavonoïdes	12
5.1.3. Les coumarines	13
5.1.4. Les tanins	13
5.1.5. Les stilbènes	14
5.2. Les alcaloïdes	14
5.3. Les terpénoïdes (composé terpénique)	14
6. Activités thérapeutiques des métabolites secondaires	15

Chapitre III : La plante médicinale étudiée « *Melissa officinalis* »

1. Généralité sur la plante	17
1.1. Description botanique	17

1.2. Caractères et propriétés organoleptiques.....	19
1.3. Origine et répartition géographique.....	19
1.4. Culture et récolte de la Mélisse	20
1.5. Etymologie et dénomination de la Mélisse.....	20
1.6. Type de Mélisse.....	21
1.7. Taxonomie de Mélisse.....	21
1.8. Composition chimique	21
1.9. Utilisation thérapeutique.....	23
1.10. Mode d'utilisation.....	23
1.11. Toxicologie.....	24

Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique.....	26
1.1. Matériel végétal.....	26
1.2. Extraction	26
1.3. Calculs des rendements	27
1.4. Tests phytochimiques.....	27
1.5. Dosage des composés phénoliques	28
1.5.1. Polyphénols totaux	28
1.5.2 Flavonoïdes totaux	29
1.5.3 Tanins condensés	29
2. Evaluation de l'activité antioxydante	32
2.1. Piégeage du radical DPPH	32
2.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	33
2.3. Piégeage de l'ABTS	33
3. Etude de la corrélation.....	32

Résultats et interprétation

1. Rendements des extraits	36
2. Tests phytochimiques.....	36
3. Dosage des métabolites secondaires	37
3.1 Dosage des polyphénols totaux	37
3.2 Dosage des flavonoïdes	38
3.3 Dosage des tanins condensés.....	39

4. Evaluation de l'activité antioxydante	40
4.1. Piégeage du radical DPPH	40
4.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	43
4.3. Piégeage de l'ABTS	45
5. Etude de la corrélation.....	47
<i>Discussion générale</i>	49
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	54
<i>Références bibliographiques</i>	57
<i>Annexes</i>	69

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales substances antioxydantes	8
Tableau 2 : Activités biologiques de quelques métabolites secondaires	15
Tableau 3 : Résultats des tests phytochimiques des extraits de <i>Melissa officinalis</i>	37
Tableau 4 : Les teneurs en polyphénols totaux en $\mu\text{g EAG/ mg d'}$ extrait.....	38
Tableau 5 : Les teneurs en flavonoïdes totaux en $\mu\text{g EC/ mg d'}$ extrait.....	39
Tableau 6 : Les teneurs en tanins condensés en $\mu\text{g EC/ mg d'}$ extrait.	40
Tableau 7 : Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>Melissa officinalis</i>	41
Tableau 8 : Les CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>Melissa officinalis</i>	43
Tableau 9 : Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de <i>Melissa officinalis</i>	45
Tableau 10 : La corrélation entre les différents composés phénoliques et la capacité antioxydante.....	47

Liste des figures

Figure 1 : : Le déséquilibre de la balance entre les radicaux libres et le système de défense antioxydant	5
Figure 2 : Classification des composés phénoliques (polyphénols)	11
Figure 3 : Structure des dérivés de l'acide phénolique	12
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes	12
Figure 5 : Structure de base des coumarines	13
Figure 6 : Structure des tanins condensés.....	13
Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables.....	13
Figure 8 : Structure de stilbène	14
Figure 9 : Structure d'un alcaloïde: caféine	14
Figure 10 : Structure d'isoprène	15
Figure 11 : Partie aérienne de <i>Melissa officinalis</i> L.	17
Figure 12 : La feuille de <i>Melissa officinalis</i>	18
Figure 13 : La fleur et la calice de la Melissa	18
Figure 14 : Le diagramme floral de <i>Melissa officinalis</i>	19
Figure 15 : La composition de <i>Melissa officinalis</i> et ses effets pharmacologiques	22
Figure 16 : Les parties aériennes (feuilles-tiges) de <i>Melissa officinalis</i>	26
Figure 17 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental réaliser sur la plante <i>Melissa Officinalis</i>	31
Figure 18 : Rendements des deux extraits de <i>Melissa officinalis</i>	36
Figure 19 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux....	38
Figure 20 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	39
Figure 21 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés.....	40
Figure 22 : Pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et standard	42
Figure 23 : Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et le standard.	44
Figure 24 : Evolution des pourcentages d'inhibitions du radical libre ABTS en fonction des concentrations des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et standard. A	46

الملخص

المركبات الطبيعية المستخلصة من النباتات لها استعمالات مختلفة في التكنولوجيا الحيوية، في المستحضرات الطبية والتجميلية والمواد الغذائية. من بين هذه الجزيئات، نجد غالبية المواد الثانوية التي يتضح استعمالها في العديد من المجالات حتى في العلاج. مع وضع ذلك في الاعتبار، سعينا في هذا العمل إلى التأثير المضاد للأوكسدة في المختبر لأربعة مستخلصات من الجزء الجوي من نبات ميليسا (*Melissa officinalis*) للاستخدام المحتمل في مجال الأدوية أو الأغذية الزراعية.

تم إعداد أربعة مستخلصات باستخدام مذيبين (الهيدروميثانول والكلوروفورم) ووضعين مختلفين للاستخراج (البارد والارتجاج). تم إجراء الاختبارات الكيميائية النباتية باستخدام تقنيات تستند إلى تغيير اللون والترسيب والتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية. تم تحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويد والعفص المكثف من المستخلصات الأربعة بواسطة تقنيات قياس الطيف. تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام طرق تعتمد على نقل الإلكترون المفرد (DPPH و ABTS) ونقل ذرة الهيدروجين (FRAP).

أظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي تم إجراؤه على الجزء العلوي لميليسا وجود قلويدات وتربينويدات والسكريات المرجعة بكميات كبيرة، كما كشف عن وجود كميات أقل من التانينات والفلافونويد والصابونين.

أشار التحليل الكمي للمركبات الفينولية إلى وجود محتويات كبيرة من البوليفينول والفلافونويد في مستخلصات الهيدروميثانول تحت الارتجاج حيث قدرت ب 179,37 ميكروغرام معادل لحمض الغاليك/ملغ من المستخلص و110,74 ميكروغرام معادل لحمض الكاتشين/ملغ من المستخلص على التوالي. والعفص المكثف في مستخلص الكلوروفورم تحت الارتجاج (1970,5 ميكروغرام معادل لحمض الكاتشين/ملغ من المستخلص).

أظهرت قدرة مضادات الأوكسدة لمستخلص الهيدروميثانول تحت الارتجاج أهمية كبيرة في اختبارات إزالة الجذور الحرة DPPH و ABTS ($14,24 \pm 253,26$ ميكروغرام / مل، $14,06 \pm 856,17$ ميكروغرام / مل على التوالي) مقارنة بمستخلص الكلوروفورميك ($12,98 \pm 414,11$ ميكروغرام / مل، $8,6 \pm 1500$ ميكروغرام / مل على التوالي). تظهر النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل ثراء ميليسا في الجزيئات الكيميائية التي يمكن أن تمثل مصدراً جديداً للمواد النشطة بيولوجياً في العلاج.

الكلمات المفتاحية: ميليسا، المستخلصات الخام، مركبات ثانوية، مركبات فينولية، نشاط مضاد للأوكسدة.

Résumé

Les composés naturels d'origine végétale présentent des intérêts très recherchés dans la biotechnologie, industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Parmi ces molécules, on trouve une majorité des métabolites secondaires qui sont illustrés dans nombreux domaines même en thérapie. Dans cette optique, nous avons recherché dans ce travail l'effet antioxydant in vitro de quatre extraits de la partie aérienne de la plante *Melissa officinalis* pour une éventuelle utilisation dans le domaine pharmacologiques ou agroalimentaire.

Quatre extraits ont été préparé en utilisant deux solvant (hydrométhanol et chloroforme) et deux modes d'extraction (à froid et sous reflux) différents. Les tests phytochimiques ont été réalisés par techniques basées le changement de couleur, la précipitation et la visualisation sous lumière ultra-violette. Les Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins condensés des quatre extraites ont été effectués par des techniques spectrophotométriques. L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'électron singulier (DPPH et ABTS) et le transfert d'atome d'hydrogène (FRAP).

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie aérienne de *Melissa officinalis* a montré la présence des alcaloïdes, terpénoïdes et les sucres réducteurs en quantité importante. Il a révélé aussi des quantités plus faibles en tanins, flavonoïdes et des saponines.

L'analyse quantitative des composés phénoliques a indiqué la présence des teneurs considérables en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits hydrométhanolique sous reflux (179,37 µg EAG /mgE et 110,74 µg EC/ mgE respectivement) et en tanins condensés dans l'extrait chloroformique sous reflux (1970,5 µg EC/mg E).

Le potentiel antioxydant de l'extrait hydrométhanolique sous reflux s'est montré très intéressant avec les tests de piégeage des radicaux libres ABTS et DPPH ($CI_{50} = 253,26 \pm 14,24$ µg/mL et $CI_{50} = 856,17 \pm 14,06$ µg/mL respectivement) par rapport l'extrait chloroformique ($CI_{50} = 414,11 \pm 12,98$ µg/mL et $CI_{50} = 1500 \pm 8,6$ µg/mL respectivement).

Les résultats obtenus dans ce travail révèlent la richesse de *Melissa officinalis* en biomolécules qui pourraient représentés une nouvelle source de substances bioactives en thérapeutique.

Mots clés : *Melissa officinalis*, extraits bruts, métabolites secondaires, composés phénoliques, activité antioxydante.

Abstract

Natural compounds from plant are of high interest and are requested in biotechnology, and in the pharmaceutical, food and cosmetic industries. Among these molecules, we find a majority of secondary metabolites that are illustrated in many fields even in therapy. In this context, in this work we researched the *in vitro* antioxidant effect of four extracts of the aerial part of the *Melissa officinalis* plant for possible use in the pharmacological or agro-food field.

Four extracts were prepared using two different solvents (hydromethanol and chloroform) and two extraction methods (cold and under reflux). The phytochemical tests were carried out by techniques based on color change, precipitation and visualization under ultraviolet light. The assay of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins of the four extract were carried out by spectrophotometric techniques. The antioxidant activity was evaluated by methods based on singular electron transfer (DPPH and ABTS) and hydrogen atom transfer (FRAP).

The qualitative phytochemical examination carried out on the aerial part of *Melissa officinalis* showed the presence of alkaloids, terpenoids and reducing sugars in large quantities. It also revealed lower amounts of tannins, flavonoids and saponins.

Quantitative analysis of phenolic compounds indicated the presence of considerable contents of polyphenols and flavonoids in the hydromethanolic extracts under reflux (179,37 μg EAG / mgE and 110,74 μg EC / mgE respectively) and condensed tannins in the chloroform extract under reflux (1970,5 μg EC/mg E).

The antioxidant potential of the hydromethanolic extract under reflux was shown to be very interesting with the ABTS and DPPH free radical scavenging tests ($\text{IC}_{50} = 253,26 \pm 14,24$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ and $\text{IC}_{50} = 856,17 \pm 14,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) compared with chloroform extract ($\text{IC}_{50} = 414,11 \pm 12,98$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ and $\text{IC}_{50} = 1500 \pm 8,6$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively).

The results obtained in this work reveal the richness of *Melissa officinalis* in biomolecules, which could represent a new source of bioactive substances in therapy.

Key words: *Melissa officinalis*, crude extracts, secondary metabolites, phenolic compounds, antioxidant activity.

Introduction générale

Depuis de nombreuses années, les sciences biologiques et médicales ont été influencées par la notion du stress oxydatif, où la cellule perd la capacité de contrôler la présence des radicaux libres (**Favier, 2003**).

Plusieurs affections humaines ou animales sont liées directement ou indirectement au stress oxydatif dans leur pathogénèse. Dans certaines maladies graves, le stress oxydatif est le premier paramètre déclencheur notamment celles liées au vieillissement, au cancer, aux maladies oculaires et neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) (**Favier, 2006**). C'est pour cette raison, l'étude et la recherches des composés à l'activité antioxydante peut contribuer contre l'évolution de ces maladies.

Les plantes dites médicinales constituent une source essentielle de molécules (flavonoïdes, alcaloïdes et terpénoïdes) qui sont connues par leurs propriétés thérapeutiques tel que : activité antioxydante, antidiabétique, anticancéreuse, antibactérienne (**Aires et al., 2013**). Environ un quart des 400000 espèces de plantes médicinales dans le monde ont été utilisées à des fins thérapeutiques dans divers sociétés (**Benayad, 2008**).

La mélisse officinale ou *Melissa officinalis* est une plante herbacée vivace de la famille des Lamiacées. C'est une plante qui a été consommée par l'homme depuis l'antiquité. La mélisse est le plus couramment utilisée pour ses propriétés calmantes et relaxantes. En fait, elle régule l'influx nerveux et elle est bonne pour la tachycardie ; elle réduit également les spasmes de l'estomac et du côlon ; et elle a des propriétés antifongiques (**Boudjema et al., 2021**).

La plupart des travaux étudiant la composition chimique de *M officinalis* parus dans la littérature scientifique portent essentiellement sur l'huile essentielle et les polyphénols qu'elle contient (**Zarei et al., 2014; Miraj et al., 2017; Gabriela et al., 2022**).

Dans ce contexte, ce travail expérimental s'intéresse à l'évaluation de l'activité antioxydante de quatre extraits obtenus à partir des feuilles et tiges de la plante *M. officinalis*

Cette étude comporte deux parties :

- ✚ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les oxydants et les antioxydants, la plante étudiée, la classification et l'intérêt des métabolites secondaires.
- ✚ La deuxième partie s'intéresse à l'étude expérimentale et comporte :
 - Le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail
 - Les résultats trouvés et leur discussion
- ✚ Ce travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse bibliographique

Chapitre 01

Le stress oxydant

1. Les radicaux libres :

Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques hautement réactives et instables avec des électrons non appariés dans leurs orbitales externes (**Omodonisi et al., 2017**). Un électron non apparié désigne un électron qui occupe une orbite atomique ou moléculaire par lui-même (**Mezouar, 2013**).

Ce déséquilibre n'est que transitoire et peut être corrigé en transférant cet électron libre vers une autre molécule, ou en acceptant un électron (**Chaouach, 2014**).

Ils comprennent deux types de molécules, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les espèces réactives d'azote (ERA) (**kalam et al., 2012**).

1.1. Classes des radicaux libres :

Les espèces réactives de l'azote (ERA) sont des espèces issues du métabolisme de l'azote (via les NO synthèses) et qui sont principalement représentées par l'oxyde nitrique (NO), les oxydes de l'azote (l'anhydride nitreux N_2O_3 et l'ion peroxydinitrite $ONOO^-$) (**Guertens et al., 2002**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont de deux types :

1.1.1. Radicaux libres primaires :

Les radicaux libres primaires sont formés directement à partir de l'oxygène tel que : Ion superoxyde (O_2^-), Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), Radical hydroxyle (OH^\bullet), Oxygène singulet (1O_2) (**Oldham et al., 1998 ; Le Cren, 2004**)

1.1.2. Radicaux libres secondaires :

Ils ne sont pas formés spontanément mais par la réaction d'un radical libre primaire sur une composante cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines) (**Oldham et al., 1998**).

1.2. Principales sources des radicaux libres :

Les RL ne sont pas produits uniquement en réponse à un stress, mais sont également produits de façon naturelle par l'organisme au cours de phénomènes biologiques (**Marvin, 2005**).

Il existe deux types de production des radicaux libres :

1.2.1. Origine endogène :

Jusqu'à présent, il existe plusieurs mécanismes et processus qui sont responsables de la production des RL.

❖ La plupart des ERO proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH oxydase (**Beaudeau, 2006**).

- ❖ La xanthine oxydase est une enzyme ubiquitaire utilisée dans le catabolisme de l'ATP. Elle est impliquée dans la production du radical superoxyde (**Chaouach, 2014**).
- ❖ Les radicaux libres sont produits au cours de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes (**Babior et al., 2002**).
- ❖ Les ions métalliques (le fer et le cuivre...), sont responsables de la production des RL (**Favier, 2003**).

1.2.2. Origine exogène :

L'organisme humain est vulnérable à plusieurs facteurs extérieurs capables de générer des RL tels que, le tabac, la pollution, le soleil, les rayons ultra-violet, les radiations ionisantes, un effort physique intense, une mauvaise alimentation, l'ingestion d'alcool, fibres d'amiante, pesticides, ...etc (**Afonso et al., 2007**).

2. Le stress oxydatif

Le stress oxydant se définit par l'incapacité de l'organisme vivant de se défendre contre les radicaux libres à cause du déséquilibre entre ces derniers et les défences antioxydantes (**figure 1**). Cette perturbation conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**Bensakhria, 2018**).



Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre les radicaux libres et le système de défense antioxydant (**Belaich et Boujraf, 2016**)

2.1. Les cibles biologiques de stress oxydatif

Les radicaux libres sont capables d'induire des modifications chimiques au niveau des molécules biologiques : L'acide désoxyribonucléique (ADN), protéines, lipides et les glucides

2.1.1. Les protéines :

Les protéines sont des constituants cellulaires structuraux et fonctionnels qui peuvent subir des modifications oxydatives (**Nzengue, 2008**).

La plupart des dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres sont incorrigible et peuvent entraîner des changements structurelles (fragmentation dimérisation, modification des acides aminés) et / ou fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, échec de la reconnaissance d'un récepteur par un ligand). Les acides aminés les plus sensibles à l'attaque des ERO sont : histidine, proline, cystéine, tryptophane et tyrosine (**Haleng et al., 2007**).

2.1.2. L'acide désoxyribonucléique (ADN) :

ADN est une macromolécule qu'est responsable à la transmission des caractères héréditaire d'une génération à une autre (**Nzengue, 2008**). Elle est la cible préférée pour les ERO.

Les altérations les plus communes sont : la modification des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose. Ces différents dommages de l'ADN entraînant des mutations qui représente la première étape dans les phénomènes de cancérisation (**Haleng et al., 2007**).

2.1.3. Les lipides :

Les ERO sont capable d'oxyder les phospholipides membranaires et les acides gras polyinsaturés. Les radicaux hydroxyles peuvent éliminer un atome d'hydrogène pour former des radicaux peroxydes et générer des hydroperoxydes, qui peuvent continuer à s'oxyder et libérer divers aldéhydes toxiques (**Valko et al., 2006**).

2.1.4. Les glucides :

Les mucopolysaccharides ainsi que les protéoglycanes du cartilage sont aussi des cibles des attaques oxydatives (**Favier, 2003**). De plus, l'oxydation du glucose peut se produire dans des conditions physiologiques en présence d'ions métalliques, entraînant la libération d'aldéhydes et de peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation conduit à la glycation des protéines (**Wolff et al., 1989**).

2.2. Implication du stress oxydant dans les pathologies :

L'interaction des radicaux libres avec les molécules biologiques conduisent à la perturbation de l'équilibre de l'organisme et la genèse de plusieurs pathologies. La majorité de ces pathologies apparaissent chez les personnes âgées parce que le vieillissement provoque la diminution de défences antioxydantes et l'augmentation de la production des radicaux libres (**Favier, 2006**).

Parmi ces pathologies nous avons le :

- Cancer (**Kaushal et kudva, 2013**).
- Diabète (**Mima, 2013**).

- Maladies neurodégénératives (Maladie d'alzheimer (**Aruoma, 2003**) et la maladie de parkinson (**Pizza et al., 2013**).
- Maladies cardiovasculaires: Athérosclérose, hypertension (**De Marchi et al., 2013**).
- Obésité (**De Marchi et al., 2013**).
- Maladies oculaires : cataracte (**Chakraborty et al., 2007**).
- Maladies respiratoires: bronchospasme aigu, asthme (**Kusano et Ferrari, 2008**).
- Maladies du foie: fibrose, cirrhose (**Shin et al., 2013**).

3. Les antioxydants

Un antioxydant est une substance qui est capable d'inhiber ou ralentir la formation des radicaux libres. Elle est présente à une concentration très faible lorsqu'elle entre en compétition avec des substrats oxydables (**Duncan et al., 2014**).

3.1.Moyens de défense

3.1.1. Défenses endogènes (Les antioxydants enzymatiques)

Les antioxydants enzymatiques sont utilisés comme une première ligne de défense de l'organisme contre les radicaux libres tel que : la catalase, le superoxyde dismutases SOD et la glutathion peroxydase GPx (**Garait, 2006**).

- La catalase (CAT):

C'est une enzyme dépendante du fer présentée a forte concentration dans le foie et les érythrocytes. Pour empêcher la formation des radicaux libres, elle permet la réduction de H_2O_2 en H_2O (**Sung et al., 2013**).

- Le superoxyde dismutases (SOD) :

Il s'agit d'une métalloenzyme qui catalyse la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Arora et al., 2002**).

- Le glutathion peroxydase (GPx):

C'est une enzyme dépendante de sélénium qui peut convertir le peroxyde d'hydrogène(H_2O_2) en eau (H_2O).

3.1.2. Défenses exogènes (Les antioxydants non enzymatiques) :

Les antioxydants non enzymatiques sont considérés comme une deuxième ligne de défense complémentaire lors d'une insuffisance des réserves antioxydantes. Ils sont apportés par l'alimentation soit sous forme d'oligoéléments qui sont utilisés comme un cofacteur d'enzyme à action antiradicalaire tel que le cuivre, le fer, le manganèse, le sélénium et le zinc (**Vergani et al., 2004**) ou bien sous forme de vitamine comme la vitamine A (rétinol) ,

vitamine C (l'acide ascorbique) et vitamine E (tocophérol) et les caroténoïdes ou se forme de métabolites secondaires issus des végétaux (flavonoïdes, acides phénoliques, coumarines, etc.) (Defraigne et Pincemail, 2008).

3.1.2.1. Les vitamines :

- **La vitamine E (α -tocophérol) :**

C'est un antioxydant majeur qui assure la protection des membranes cellulaires de l'oxydation par les radicaux libres lipidiques générés lors de la peroxydation lipidique (Traber et Atkinson, 2007).

- **La vitamine C (L'acide ascorbique) :**

C'est un antioxydant soluble dans l'eau présent dans les plantes et les animaux. Il est un puissant piègeur et réducteur qui neutralise les radicaux libres (Kohen, 2002).

- **Les caroténoïdes :**

Ce sont une classe de pigments végétaux qui jouent un rôle important dans la prévention des maladies humaines en protégeant contre les dommages oxydatifs. Le β -carotène est un précurseur du rétinol (vitamine A) et agit comme un antioxydant (Delattre *et al.*, 2005).

Le tableau (1) ci-dessous résume les principales substances utilisées pour lutter contre les substances oxydables (Pokorny *et al.*, 2001 ; Le Cren, 2004).

Tableau 1 : Principales substances antioxydantes (Pokorny *et al.*, 2001 ; Le Cren, 2004)

Antioxydants enzymatiques	Antioxydants non enzymatiques naturelles			Antioxydants de synthèse
	Enzymes cytosoliques	Vitamines	Minéraux	
*GPX (Glutathion Peroxydase) *GRD (Glutathion réductase) *SOD (Superoxyde Dismutase) *Catalase	*Vit C *Vit A (Rétinol) *Vit E (tocophérol) *Vit B5 (A. pantothénique)	*Sélénium *Zinc *Cuivre *Magnésium *Anhydride sulfureux (SO ₂)	*Polyphénols (flavonoïdes, coumarines...) *Terpènes	*BHT (3,5ditertobutyl-4hydroxytoluène) *BHA (3-tertiobutyl4-hydroxyanisole) *TBHQ (tertiobutylhydroxyquinone) *Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8- tetraméthylchroman-2-carboxylique) *Gallate de propyle (E310) *Gallate d'octyle (E311) *Gallate de dodécyle (E312)

Chapitre 02

La phytothérapie et les

Plantes médicinales

Synthèse bibliographique

chapitre 2 : La phytothérapie et les plantes médicinales

1. La phytothérapie

Le mot de phytothérapie vient de grec, il est composé de deux mots : « phuton » signifie plante et « therapeia » signifie traitement. Donc ce mot veut dire « soigner par les plantes ». La phytothérapie est considérée comme une médecine alternative à base des plantes ou leurs extraits (**Mansur, 2015**).

2. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies selon la pharmacopée française comme des drogues végétales (médicaments) dont au moins une partie (les racines, les feuilles, bulbes, les graines, les fruits ou les fleurs..) possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes (fraîche ou sèche) constituent des remèdes naturels qui peuvent être utilisés comme moyen thérapeutique curatif et préventif. L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie se fait soit par un usage interne le plus souvent des tisanes soit par un usage externe comme des pommades, des crèmes et des compresses (**Eddouks et al., 2007**).

Les plantes médicinales agissent sur le corps humain ou animal de manière bénéfique. Elles sont utilisées en médecine naturelle mais aussi à des fins cosmétiques, aromatiques, alimentaires, industrielles ou d'hygiène (**Brunten, 2009**).

Les composés organiques des plantes médicinales sont divisés en deux groupes : les métabolites primaires et métabolites secondaires.

3. Métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont des composés organiques qui existent dans toutes les cellules végétales et jouent des rôles essentiels dans la photosynthèse, la reproduction, le développement des cellules incluant les protéines et le métabolisme tel que les glucides, les lipides et les acides nucléiques (**François, 2010**).

4. Métabolites secondaires :

Ce sont des molécules naturelles produites par les plantes en petite quantité. Ils ne sont pas directement impliqués dans les processus physiologiques d'un organisme, mais ils peuvent servir dans d'autres processus vitaux pour la plante. Ils regroupent : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (**Ali et al., 2013**).

5. Classification des métabolites secondaires

5.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires qui regroupent plusieurs classes chimiques et environ 8000 molécules (**figure 2**) principalement les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines (**Luthria et al., 2006**).

Ces classes chimiques se caractérisent tous par un point commun qui est la présence d'un noyau aromatique à six carbones, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

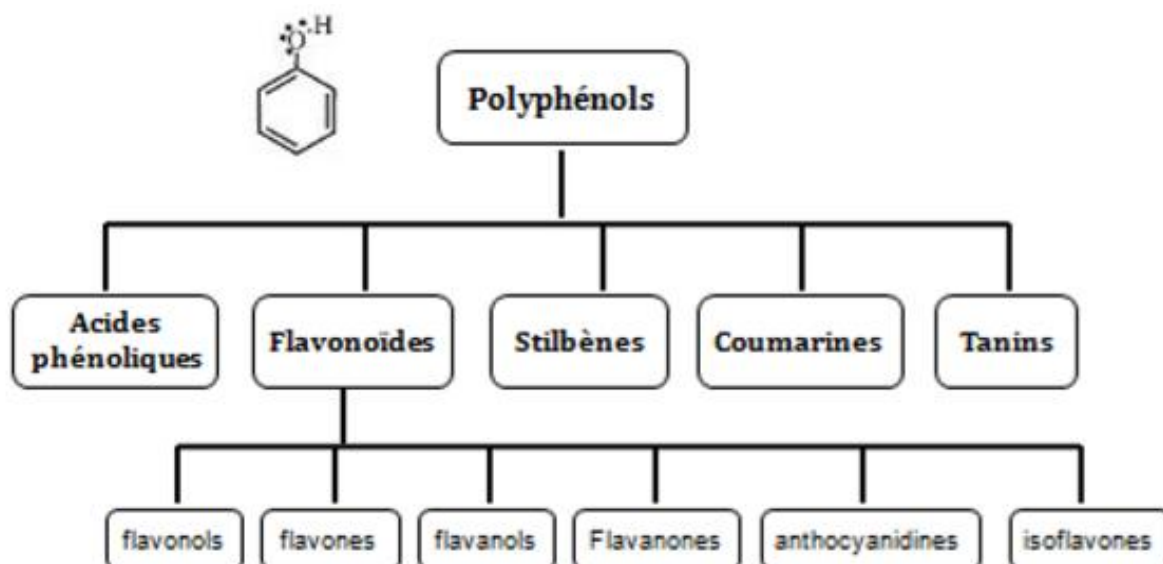


Figure 2 : Classification des composés phénoliques (polyphénols) (**Macheix et al., 2005**)

5.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont une classe des composés phénoliques qui se trouvent principalement dans les aliments et de nombreuses plantes médicinales. Ils ont une fonction carboxylique et un ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils ont deux structures principales (**figure 3**)(**Pandey et Rizvi, 2009**).

- Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) sont moins fréquents que les acides hydroxycinnamiques (C6-C3). Ces derniers comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Pandey et Rizvi, 2009**).
- L'acide hydroxybenzoïque et ses dérivés: l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide syringique et l'acide protocatéchuïque (**Khoddami et al., 2013**)

Synthèse bibliographique

chapitre 2 : La phytothérapie et les plantes médicinales

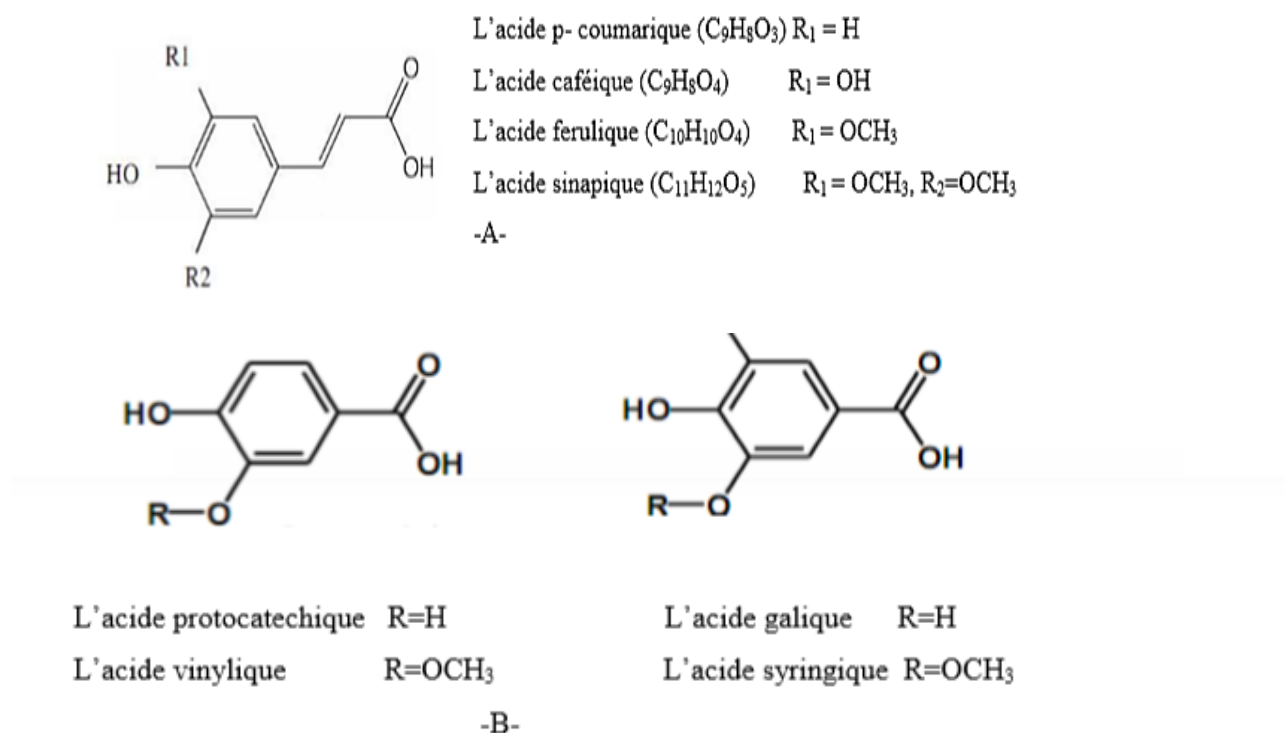


Figure 3 : Structure des dérivés de l'acide phénolique: A- Acides hydroxycinnamiques, B- Acides hydroxybenzoïques (Tsao, 2010 ; Mccarthy *et al.*, 2013).

5.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus fréquents dans l'alimentation humaine. Ils sont responsable de la coloration rouge, orange et jaune de différentes parties de la plantes (feuilles, fleurs, fruits, graines..) (Chae *et al.*, 2013). Ils sont dérivés de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6))(figure 4)(Macheix *et al.*, 2005).

Les flavonoides sont classés en six sous-classes: les flavanones, les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les anthocyanes et les isoflavones (Balasuriya et Rupasinghe, 2011).

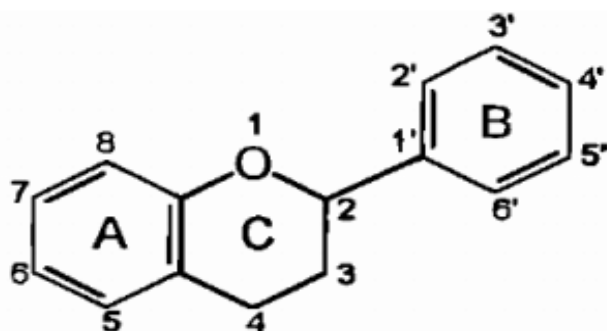


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Balasundram *et al.*, 2005).

5.1.3. Les coumarines

Synthèse bibliographique

chapitre 2 : La phytothérapie et les plantes médicinales

Ce sont des hétérocycles ayant une structure de base de benzo-2-pyrone (C6-C3) (Srikrishna *et al.*, 2018) (figure 5). Elles sont largement distribuées dans le règne végétal et sont dotées d'activités biologiques diverses comme : l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et vasodilatatrice (Cowan, 1999).

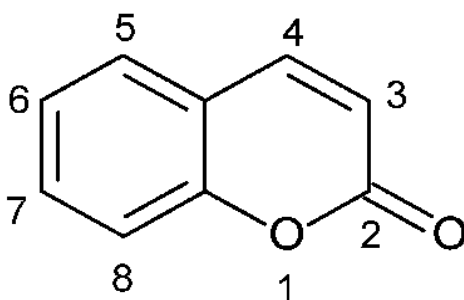


Figure 5 : Structure de base des coumarines (Iwueke et Nwodo, 2008)

5.1.4. Les tanins

Les tanins représentent la classe la plus importante des métabolites secondaires. Ce sont des molécules de poids moléculaires élevés (entre 500 et 3000 Da) (Sereme *et al.*, 2010). Ils se caractérisent par un goût astringent dû à la précipitation des protéines salivaires, qui produit une sensation de sécheresse en bouche (Peronny, 2005).

Généralement, ils sont divisés en deux groupes (figure 6 et 7) : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Okuda et Ito., 2011).

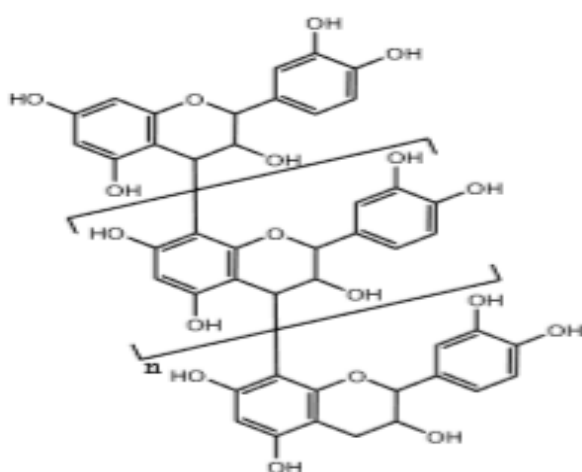


Figure 6 : Structure des tanins condensés (peronny, 2005)

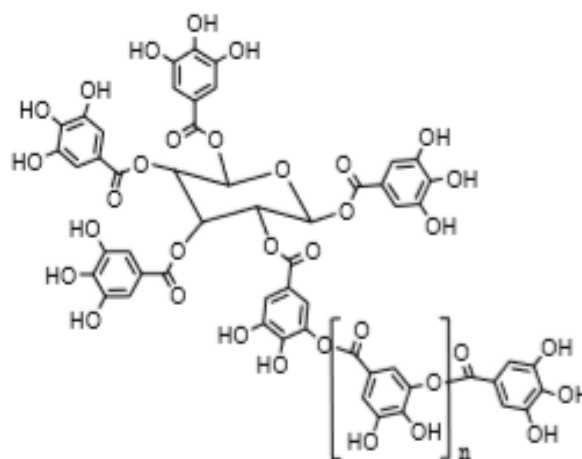


Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables (peronny,2005)

5.1.5. Les stilbènes

Synthèse bibliographique

chapitre 2 : La phytothérapie et les plantes médicinales

Les stilbènes sont caractérisés par une structure de type C6-C2-C6 (figure 8) et contiennent au moins deux noyaux aromatiques reliés entre eux par une double liaison (**Bruneton, 2009**).

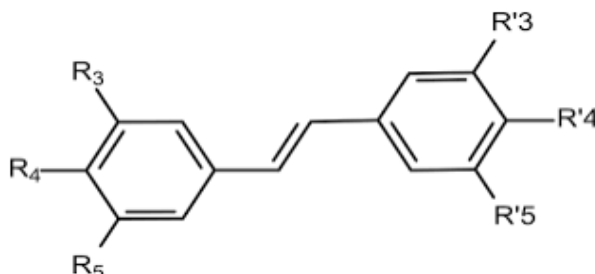


Figure 8: Structure de stilbène (**Perret, 2001**).

5.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés organiques naturels (le plus souvent végétale), hétérocycliques et alcalins qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote dans leurs structures (figure 9) (**Donatien, 2009**). Généralement, ils sont divisés en trois types : les alcaloïdes vrai qui contient au moins un hétérocycle, les proto-alcaloïdes dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique et les pseudo- alcaloïdes qui ne sont pas des dérivés des acides aminées contrairement aux précédents (**Rakotonanahary, 2012**).

Les alcaloïdes sont trouvés dans plusieurs familles de plantes telle que: la morphine, la quinine, la caféine...(**Sebai et Boudali, 2012**).

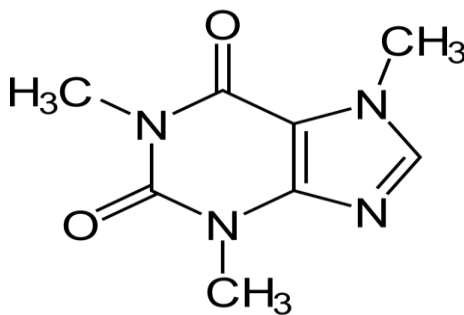


Figure 9: Structure de la caféine (**Aniszewski, 2007**)

5.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes ou les terpènes sont des composés généralement lipophile, à structure hydrocarbonée formés par la fusion d'unités d'isoprène à cinq carbones C₅H₈ (figure 10). Ils peuvent être d'une structure linéaire ou sous forme d'un cycle (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprène dans la molécule. On distingue : les monoterpènes (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅), les diterpènes (C₂₀), les triterpènes (C₃₀), et les tétraterpènes (C₄₀) (**Guignard, 1996 ; Cowan, 1999**).

Synthèse bibliographique

chapitre 2 : La phytothérapie et les plantes médicinales

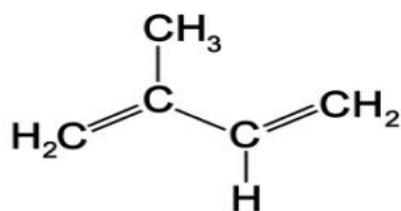


Figure 10 : Structure de l'isoprène (Muanda, 2010)

6. Les activités biologiques des différentes classes des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnues par leurs propriétés physico-chimiques telles que : les propriétés antioxydante, antivirale, antifongique, antimicrobienne, cicatrisantes, anti-inflammatoire.... (tableau 2).

Tableau 2 : Activités biologiques de quelques métabolites secondaires

Métabolites secondaires	Activités biologiques	Références
Acides phénoliques	Antioxydante, antibactérienne, antifongique, anti-ulcéreuse	Flores <i>et al.</i> , 2009 Kim <i>et al.</i> , 2010
Alcaloïdes	Anti-cancer, antidiabétique, effet sur les troubles nerveux	Iserin <i>et al.</i> , 2001 Azzi, 2013
Flavonoïdes	Anti-tumorale, antivirale, antioxydante, anti-inflammatoire, anti-allergique, analgésique, cardiovasculaire	Friedman <i>et al.</i> , 2006 Cushnie <i>et al.</i> , 2007 Hooper <i>et al.</i> , 2008 Batovska <i>et al.</i> , 2009
Coumarines	Anti-inflammatoire, antiparasitaire, anticoagulant, analgésique	Ito <i>et al.</i> , 2005 Bruneton, 2009 Smyth <i>et al.</i> , 2009
Tanins	Antioxydante, anti-inflammatoire Piégeurs des radicaux libres	Kubata <i>et al.</i> , 2005 Bruneton, 2009

Chapitre 03

**La plante étudiée *Mélissa*
*officinalis***

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 100.000 possèdent des propriétés biologiques et médicamenteuses (**Benkhniue et al., 2011**).

Le présent travail vise à étudier les la composition chimique et l'activité antioxydante d'une plante qui appartient à la famille des lamiacées (Lamiaceae)à savoir « *Melissa officinalis L.* »

1. Généralité sur la plante *Melissa officinalis L.* :

Les Lamiaceae ou Labiatae (Lamiacées ou Labiées) sont une importante famille de plantes médicinales notamment en raison de la présence des huiles essentielles fortement aromatiques, les tanins, les saponines et les acides organiques (**Ramasubramania Raja,2012**). *Melissa officinalis L.* (figure 11) communément appelée mélisse, est une plante médicinale bien connue dans la famille des Lamiacées. Depuis plus de 2000 ans, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour diverses affections (**Sadiya et Roohi, 2013**).



Figure 11: Partie aérienne de *Melissa officinalis L.* (**Flora Gallica : page 801**)

1.1. Description botanique :

La mélisse, du nom scientifique *Melissa officinalis L.*, est une plante herbacée vivace avec des racines fibreuses minces, cylindriques et dures (**Bardeau, 2009**). Elle est de 30 – 80 cm de hauteur et est caractérisée par des tiges quadrangulaires sont rameuses et très feuillées, elles sont velues vers leur sommet et près des nœuds et sont glabres dans le reste de son étendue (**Baba Aissa, 1999 ; Girre, 2001**) ; « La partie utilisée de la mélisse c'est la feuille et de façon plus générale, les parties aériennes de la plante ».

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

➤ **Les feuilles** sont largement ovales, ou ovatolancéolées, crénelées (**Figure 12**). La longueur du pétiole varie de 1 à 1,2 cm, tandis que celle du limbe est d'environ 2,5x1-3,5x1,2 cm (**Sadiya et Roohi, 2013**), elles sont vertes foncé et en forme de cœur.

La surface de la feuille est grossière et profondément nervurée, le bord de la feuille est festonné ou denté (**Moradkhani et al., 2010**). Lorsqu'elles sont froissées, elles exhalent un parfum doux et citronné (**Bianchini et Corbetta, 1975**).

➤ **Les fleurs** sont rassemblées en grappes axillaires à l'aisselle des feuilles supérieures par groupes de 3 à 12 fleurs se tournent du même côté avec une couleur jaune en bourgeons, puis blanc, rose ou bleu pâle.

La floraison a lieu de juin à septembre (**Bianchini et Corbetta, 1975 ; Bartels, 1998**) ; D'après les mêmes auteurs, le calice mesure environ 8 mm de long, formé de cinq sépales dont deux inférieures et trois supérieures, est bilabié, campanulé ; La corolle se compose de cinq pétales blancs qui s'élèvent dans un tube arqué ayant une forme cylindrique évasé au sommet, elle renferme des poils courts épars. (**Figure13 et 14**).

➤ **Le fruit** c'est un tétrakène de 1,5 à 2 mm de large, constitué de quatre petits akènes ovoïdes et lisses de couleur brun foncé (**Achour et Bougaci, 2008 ; GIRRÉ, 2001**).



Figure 12 : La feuille de *Melissa officinalis*



Figure 13 : La fleur et le calice de Mélisse

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

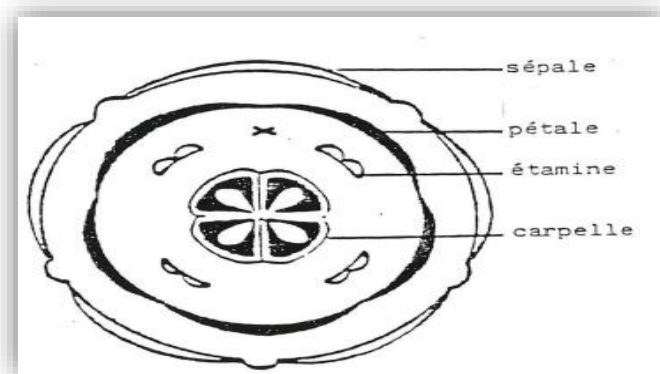


Figure 14 : le diagramme floral de *Melissa officinalis*.

1.2. Caractères et propriétés organoleptiques :

La mélisse c'est une plante aromatique, médicinale, mellifère et condimentaire ; elle ressemble à la menthe (Jorek, 1983 ; Bartels, 1998 ; Bardeau, 2009) où la monographie d'elle, dans la Xème édition de la Pharmacopée Française nous indique que la feuille a une odeur fraîche rappelant celle du citron. Elle présente aussi un saveur légèrement amère, citronnée (Nathali, 2001).

1.3. Origine et répartition géographique :

Melissa officinalis L. est une plante originaire dans les régions tempérées, Elle pousse de manière spontanée dans les lieux humides et ombragés comme les sous-bois riches en humus de (Iserin,1997 ; Boullard,2001). Elle se retrouve en :

- ✚ Afrique du nord : Algérie, Maroc
- ✚ Asie occidentale : Turquie, nord d'Iran, Inde : dans les régions tempérées de l'Himalaya, du Garhwal au Sikkim et dans les montagnes de Khassia 7 (Sadiya et Roohi, 2013).
- ✚ Europe : France : particulièrement dans les lieux frais du Midi, dans les Alpes, les-Pyrénées et même dans les environs de Paris (Rahtiyarca Bagdat et Cosge, 2006).
- ✚ Amérique : Argentine
- ✚ En Algérie, la mélisse officinale pousse spontanément au niveau des ravins humides des montagnes du Djurdjura, des Babors et de Mouzaia (Beloued, 2001) comme doit être occasionnellement cultivée en Kabylie (Baba Aissa, 1999).

1.4. Culture et récolte de la mélisse :

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

La mélisse est une plante connue par ses huiles essentielles. Elle est facile à cultiver surtout dans les conditions favorables où elle pousse très bien au soleil et même à l'ombre comme elle aime les sols frais. Elle est retrouvée dans les jardins de curés et dans les jardins médiévaux (**Jorek,1983 ; Speck et al., 2009**).

Il s'agit d'une plante qui vit au moins trois ans ; elle est buissonnante et érigée (**Mokhtarzadeh et al., 2017**).

Selon la Filière des plantes médicinales biologiques du Québec, les méthodes utilisées pour la multiplication de la mélisse se font par des méthodes traditionnelles appelées semis, division de touffes et bouturage.

La mélisse est récoltée au fur et à mesure des besoins dès le mois de mai jusqu'au septembre et de préférence juste avant ou au début de la floraison (**Sherbrooke., 2003**).

1.5. Etymologie et dénomination de la mélisse :

Le nom latin *Melissa* c'est l'origine du nom grec *Meleia* (*meli*, *melitos* = miel), *Melissa* également signifie en Grec « abeille » grâce à son nectar qui est recherché par les abeilles (**Bianchini et Corbetta, 1975**).

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

Selon les herboristes et les personnes pratiquants la médecine traditionnelle, la mélisse est appelée par des différents noms telles que citronnelle, piment des abeilles ou des ruches, céline, citronnade, thé de France (**Girre, 2001**), l'herbe au citron (**Beloued, 2001**), poncirade (**Bourgeois, 2007**)

Les noms vernaculaires de cette plante sont :

- Nom arabe et berbère : Badarendjouya, Ferzizou, Tifer n't zizoua, Tournadjan, Tizizouit, Touroundjan, Tindjan (**Baba Aissa, 1999 ; Beloued, 2001**)
- Nom Anglais: balm, lemon balm, Common Balm, sweet balm (**Bock, 2010**)
- Nom Italie : Cedronella, Citronella, Melissa vera (**Bock, 2010**)
- Nom Espagne : Melisa, Melissa, Tarongina, Toronjil (**Bock, 2010**)
- Nom Allemagne : Zitronen-Melisse (**Bock, 2010**)

1.6. Types de mélisse :

Il existe plusieurs variétés de mélisse :

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

Selon **Bourgeois**, (2007) :

- Variegata : mélisse à feuilles panachées de vert et de jaune
- Aurea : mélisse au feuillage doré.

Selon **Gilly**, (2005) :

- Citronella : parfum de citronnelle
- Lemonella : parfum plus citronné
- Lime : parfum de limette
- Quedlinburger Niederliegende : à plus forte teneur en huiles essentielles

1.7. Taxonomie de mélisse :

Conformément à Quezel et Santa, (1962), la position systématique de Mélisse est la suivante :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiosperm
- Classe : Magnolopsidae
- Ordre : Labiales (Lamiales)
- Famille : Labiées (Lamiaceae)
- Genre : *Melissa* L.
- Espèce : *Melissa officinalis* L.

1.8. Composition chimique :

Melissa officinalis est une plante médicinale riche en composés biologiquement actifs qui sont responsables de leurs effets thérapeutiques. Son analyse phytochimique préliminaire a montré la présence des flavonoïdes, des terpénoïdes, des acides phénoliques, des tanins et des huiles essentielles (**Gabriela et al., 2022**).

Les principaux constituants actifs de *Melissa officinalis* sont des composés volatils (géranium, néral, citronellal et géraniol), des triterpènes (acide ursolique et acide oléanolique), les acides phénoliques (acide rosmarinique, acide caféique et acide chlorogénique), et les flavonoïdes (quercétine, rhamnocitrine et lutéoline) et le mucilage uronique (**Miraj et al., 2017**) (**Zarei et al., 2014**).

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Melissa officinalis*

Selon des études biologiques, la mélisse contient 0,05 à 0,15% d'huile volatile dans la plante fraîche et 0,1 à 0,45% dans la matière sèche. Les aldéhydes terpéniques sont prédominants (32-42%), notamment le citral (les deux isomères) : géraniol et néral ; citronellal, alcools terpéniques (géraniol, linalol, citronelol, octen-3-ol-1) (Simona *et al.*, 2015 Amooaghaie, 2011).

Les principaux composants de l'huile essentielle des feuilles de *Melissa officinalis* selon plusieurs auteurs (Gabriela *et al.*, 2022 ; Nouri *et al.*, 2020 ; Souihi *et al.*, 2020 ; Seidler *et al.*, 2017 ; Taherpour *et al.*, 2012) sont : (E)-Caryophyllene (1.06-6.8%), Geranyl acetate (0.5-19.3%), Citral A (6.22-51.21%), Caryophellene oxide (1.3-43.55%) et β -Caryophyllene (1.3-29.14%)...

La figure 15 regroupe les principaux composants retrouvés dans la mélisse et leurs effets pharmacologiques.

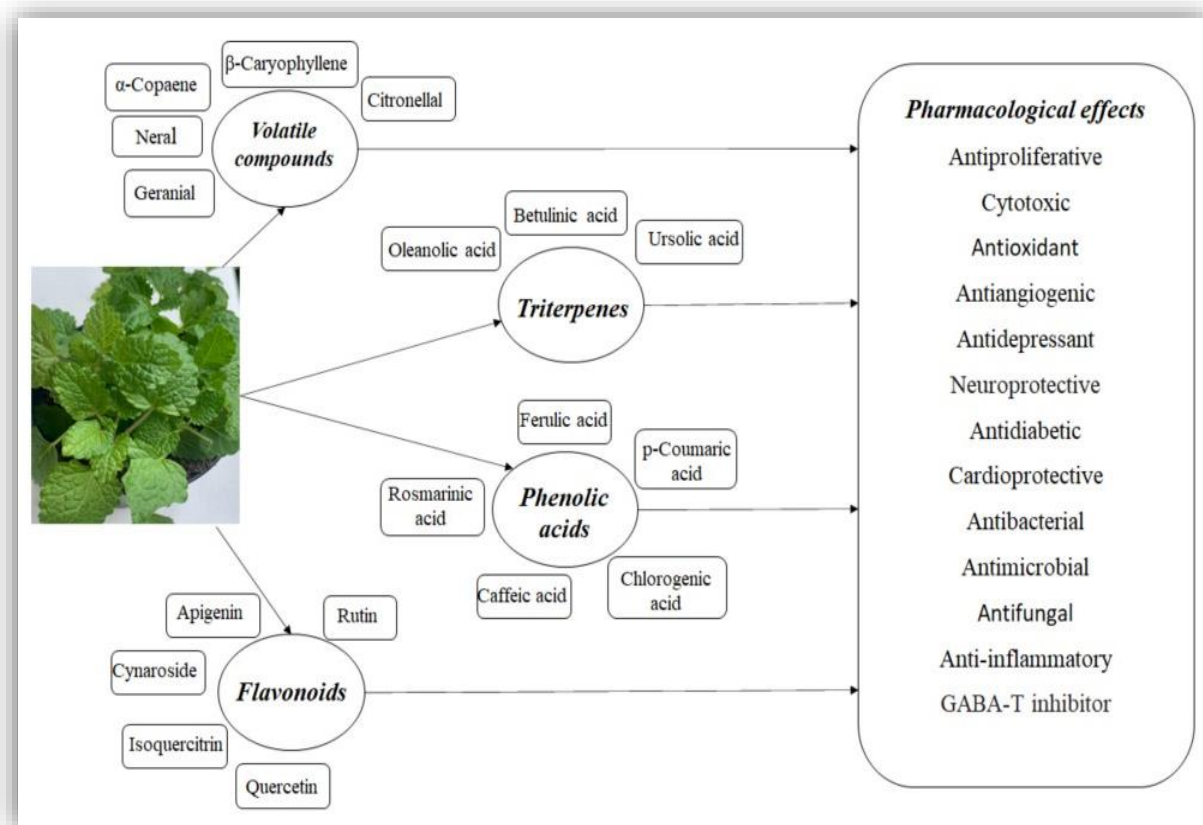


Figure 15 : la composition de *Melissa officinalis* et ses effets pharmacologiques

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Mélissa officinalis*

1.9. Utilisation thérapeutique :

Au fil des siècles, différents groupes culturels ont développé des systèmes traditionnels à base des plantes médicinales pour améliorer la santé en isolant les composés actifs de ces plantes. La mélisse est l'une de ces plantes connues qui a été utilisée depuis très longtemps pour le traitement de nombreuses maux de tête, les maladies gastro-intestinales, les maladies neurologiques et rhumatismales (Zarei *et al.*, 2015 ; Jun *et al.*, 2012 ; Wichtl, 2004).

Cette espèce présente a été connue depuis plus de 2000 ans pour ses effets sédatif et hypnotique léger (Zarei *et al.*, 2015 ; Rasmussen, 2011 ; NourEddine *et al.*, 2005). Elle agit aussi sur la réduction du rythme cardiaque. Certains auteurs ont rapporté que cette plante possède des effets biologiques tels que l'effet antibactérien, anti-inflammatoire, antispasmodique, antivirale et antioxydant (Zarei *et al.*, 2015 ; Behnam Rassouli *et al.*, 2010 ; Naghibi *et al.*, 2005).

Ghiulai, et ses collaborateurs ont étudié le potentiel d'angioprévention et de chimioprévention du cancer du sein la mélisse et sont arrivé à la conclusion que cette plante possède une à une activité antitumorale (Ghiulai, 2020).

1.10. Mode d'utilisation :

Melissa officinalis peut être utilisée selon le père de la pharmacologie, dans son livre *Materia Medica* par une décoction de feuilles pour ceux qui ont été touchés par des scorpions ou mordus par des araignées ou des chiens. Il recommande également la plante pour l'aménorrhée, la dysenterie et l'étouffement causé par les champignons (Abolfazl *et al.*, 2016).

M. Officinalis L. peut-être recommandée pour améliorer la qualité de vie des femmes ménopausées souffrant de troubles du sommeil par consommation sous forme de thé où des tisanes (Shirazi, 2021).

Elle peut être utilisée comme un bain de bouche pour soulager le mal de dents et aussi sous forme de crème pour calmer les douleurs provoquées par les piqûres d'insectes et le rhumatisme (Pizzorno et Murray, 2006).

Dès que les premiers symptômes de boutons de fièvre d'herpès débutent, elle peut être appliquée sur la peau sous forme de solution (Hosein et Rogers, 2005).

Les parties aériennes de mélisse sont utilisées généralement par infusion contre les maux de tête d'origine nerveuse en buvant une tasse 3 fois par jour où bien par teintures pour combattre l'anxiété et la dépression légère (Isern, 1997).

Synthèse bibliographique

chapitre 3 : La plante étudiée *Mélissa officinalis*

1.11. Toxicologie :

certaines études in vivo et in vitro ont montré qu'un extrait aqueux de la mélisse a provoqué une inhibition de l'activité de la TSH (Thyroid Stimulating Hormon) ce qui empêche la fixation de ce dernier sur leurs récepteurs et donc induisent une hypothyroïdie (**Santini *et al.*, 2003;EMA,2007**).

Matériel et Méthode

Matériel et méthode

Cette étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimique, synthèse et activité biologique » (Lapsab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Science de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen (Algérie).

L'objectif de cette étude de déterminer les propriétés phytochimiques de quatre extraits de la plante *Melissa officinalis* et d'évaluer leur activités antioxydante.

- **Etude phytochimique**

- .1. Matériel végétal**

La plante *Melissa officinalis* a été récoltée de la région de M'sila au cours du mois de Février 2023.

La partie aérienne (feuilles et tiges) du matériel végétal utilisé a été séparée en feuilles et tiges. Ensuite les feuilles et les tiges seules ont été séchées et broyées en petits morceaux à l'aide d'un mortier et du pilon (figure 16).



Figure 16 : La partie aérienne (feuilles et tiges) de *Melissa officinalis*

- .2. Extraction**

Pour la préparation des extraits, 20 g de matériel végétal broyé a été mis en contact avec 200 mL du solvant. Les solvants utilisés sont eau-méthanol (30/70 : V/V) et chloroforme.

Deux types d'extraction ont été réalisés : l'extraction sous reflux sous agitation pendant 1h (extraction à chaud) et l'extraction par macération pendant 72 h (extraction à froid), et ceci dans le but d'observer l'effet de la température sur les principes actifs de la plante.

Les extraits obtenus ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre et les différents filtrats ont été concentrés à sec par évaporation rotative dans un L'évaporateur rotatif – Heidolph à la température appliquée à l'évaporation de chaque solvant (60°C pour extrait hydrométhanolique et 50°C pour extrait chloroformique). Les extraits secs obtenus ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

.3. Calculs des rendements d'extraction

La quantité d'extraits secs obtenus à partir de la matière végétale exprimée par le rendement d'extraction a été calculée selon la formule :

$$\text{Rdt \%} = \left[\frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{M3}} \right] \times 100$$

M1 : Masse du ballon après évaporation

M2 : Masse du ballon avant évaporation (ballon vide)

M3 : Masse de la matière végétale sèche de départ

.4. Tests phytochimiques

Dans le but de connaître la composition des extraits étudiés, nous avons effectué une série des tests phytochimiques basés sur des réactions de coloration, de précipitation et d'observation sous lumière ultra-violette.

.4.1. Alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, nous avons introduit 0,5 mL de l'extrait à analyser. Nous avons ensuite acidifié le milieu par quelques gouttes d'HCl (1%) et ajouté 0,5 mL de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 mL de réactif de Wagner dans le second tube.

L'apparition d'un précipité blanc (réactif Mayer) ou brun (réactif Wagner) révèle la présence des alcaloïdes (**Majob, 2003**).

.4.2. Les composés phénoliques :

a. Les tanins :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de l'extrait à analyser auquel nous lui avons ajouté 0,25 mL d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange a été incubé pendant 15 min à température ambiante.

L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques et la couleur bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques (**Karumi et al., 2004**).

b. Les flavonoïdes :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de l'extrait à analyser et ajouté 1 mL de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes (**Karumi et al., 2004**).

c. Les quinones libres :

Matériel et méthode

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de l'extrait à analyser et ajouté 0,1 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyede, 2005**).

d. Anthraquinones :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de l'extrait à analyser et ajouté 1 mL de NH₄OH (10%). L'apparition d'une coloration violette après agitation indique la présence des anthraquinones (**Oloyede, 2005**).

e. Terpénoïdes : Test de Slakowski

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de l'extrait à analyser et ajouté 0,4 mL de chloroforme et 0,6 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes (**Edeoga et al., 2005**).

f. Les composés réducteurs :

A 1 mL de la liqueur de Fehling (0,5 mL réactif A et 0,5 mL réactif B) nous avons ajouté 1 mL de l'extrait à analyser. Le mélange a été incubé 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs. (**Edeoga et al, 2005**).

1.5. Dosage des composés phénoliques

1.5.1. Dosage des polyphénols totaux

1.5.1.1. Principe

Afin de doser les polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée, nous avons suivis la méthode de dosage décrite par **Vermerris et Nicholson (2006)**. Le principe de cette méthode est basé sur une réaction de coloration par le réactif Folin-Ciocalteu, de couleur jaune, composé de l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄). Ce réactif induit l'oxydation des composés phénoliques et la formation d'un complexe bleu tungstène (W₈O₂₃) - molybdènes (Mo₈O₂₃). L'absorbance a été mesurée à 700nm.

1.5.1.2.Mode opératoire

- 0,1 mL de chaque extrait (1 mg/ mL) a été mélangé avec 2 mL de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2%.
- Les tubes ont été agités puis incubés pendant 5 min
- 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) ont été ajoutés au mélange
- Les tubes ont été incubés pendant 30 min à température ambiante

Matériel et méthode

➤ La lecture de l'absorbance a été réalisée, contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

La gamme d'étalonnage a été préparée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (50 à 500 µg/ mL).

1.5.2. Dosage des flavonoïdes

1.5.2.1. Principe

Pour quantifier les flavonoïdes contenus dans les extraits de la plante étudiée nous avons utilisé la méthode de dosage colorimétrique décrite par **Zhishen *et al.*, (1999)**. Le principe de cette méthode repose sur l'oxydation des flavonoïdes en milieu alcalin par le nitrite de sodium (NaNO₂) et le chlorure d'aluminium (AlCl₃) pour former un complexe de couleur rose qui absorbe à 510 nm.

1.5.2.2. Mode opératoire

- Dans des tubes à hémolyse, 250 µL de l'extrait (1 mg/ mL) ont été mis en contact avec 1 mL d'eau distillée et 75µL du réactif NaNO₂ à 15 %.
- Les tubes ont été incubés pendant 6 min à température ambiante
- 75 µL de chlorure d'aluminium AlCl₃ à 10% ont été ajoutés au mélange.
- Après 6 min, 1 mL d'hydroxyde de sodium NaOH (4%) a été ajouté immédiatement et le volume total a été complété à 2,5 mL d'eau distillée
- Les tubes ont été agités, puis incubés pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- La lecture des absorbances a été réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 510 nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (25 à 500 µg/ mL).

1.5.3. Dosage des tanins condensés

1.5.3.1. Principe

La quantité des tanins condensés a été estimée par la méthode utilisant la vanilline. En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline et se transforment en anthocyanidols de couleur rouge mesurable par spectrophotomètre à 500 nm (**Sun *et al.*, 1998**).

Matériel et méthode

1.5.3.2. Mode opératoire

Un volume de 50 μL de chaque extrait (1 mg/ mL) a été mélangé avec 1500 μL d'une solution méthanolique de la vanilline (4%)

Après agitation, un volume de 750 μL d'HCl concentré a été ajouté dans chaque tube. Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 20 min. La lecture de l'absorbance a été réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 500 nm.

La gamme d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05 à 1 mg/mL).

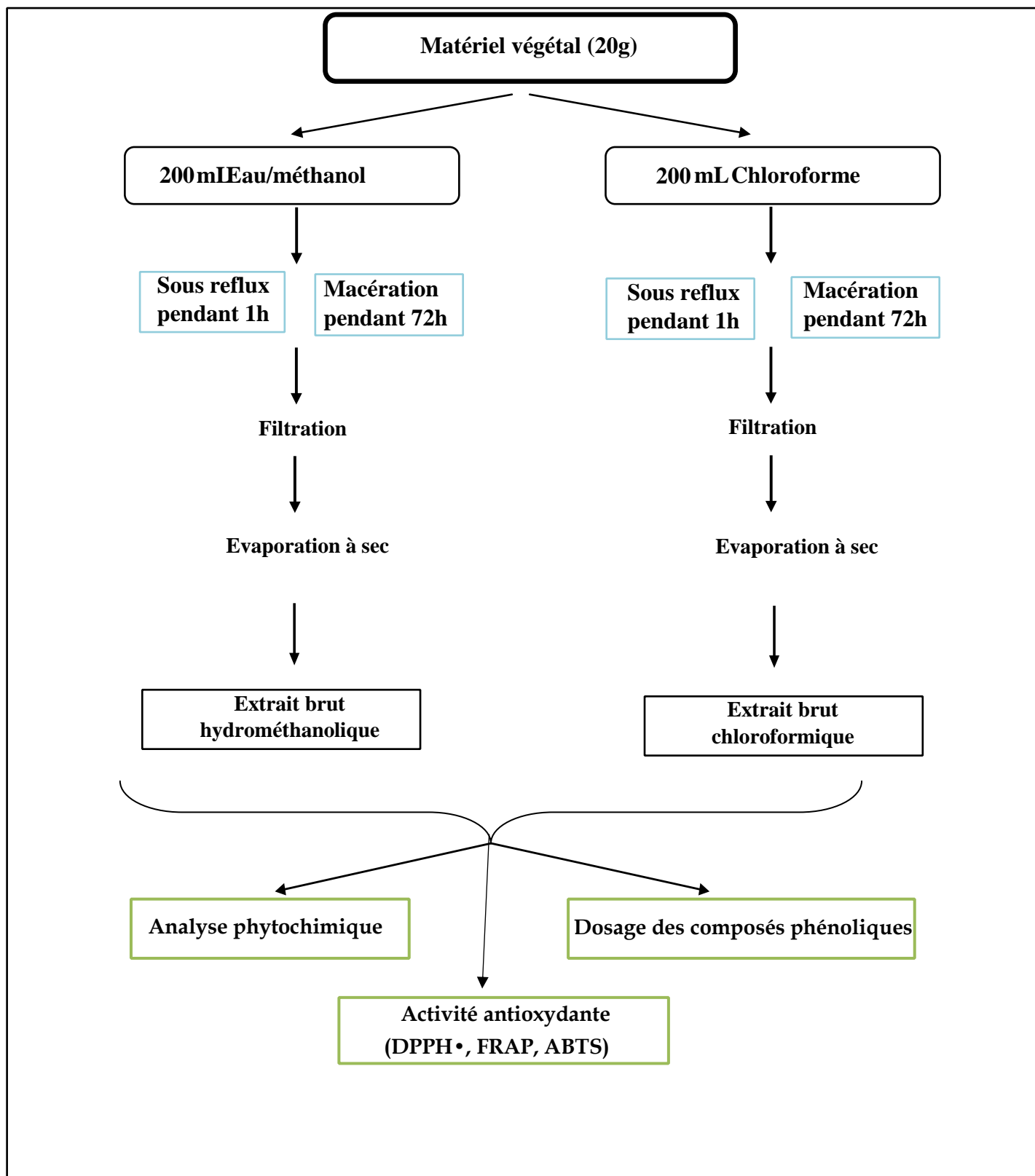


Figure 17 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental réalisé sur la plante *Melissa officinalis*.

- **Evaluation de l'activité antioxydante**

- .1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)**

- .1.1. Principe**

Dans ce test les molécules ayant un potentiel antioxydant réduisent le radical libre relativement stable, le DPPH (2,2diphényl- 1-picryl-hydrazyl), de couleur violette, en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

La recherche de l'activité antiradicalaire des extraits de *Melissa officinalis L.* a été réalisée selon le protocole décrit par **Atoui et al., (2005)**

- .1.2. Mode opératoire**

- ✓ 25 µL des solutions des extraits à différentes concentrations (0,05 à 2 mg/ mL) ont été ajoutés à 975 µL du DPPH (0,0025g fraîchement préparé dans 100ml du méthanol).

- ✓ Pour chaque concentration un blanc a été préparé contenant 25 µL de chaque concentration d'extrait solubilisé dans 975 µL du méthanol.

- ✓ Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 25 µL du méthanol avec 975 µL de la solution méthanolique de DPPH.

- ✓ La lecture de l'absorbance a été réalisée à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

- ✓ Le contrôle positif a été préparé à l'aide d'une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits

- ✓ Pour chaque concentration, le test a été répété 3 fois (triplicata).

- .1.3. Calcul des pourcentages d'inhibition**

$$I (\%) = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition.

A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif.

A_{éch} : Absorbance de l'échantillon testé.

- 2.1.4. Calcul des CI₅₀**

La CI₅₀ est la concentration de l'extrait qui provoque l'inhibition de 50% du radical libre DPPH. Elle est calculée graphiquement par les régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits étudiés. Elle permet de déterminer l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en CI₅₀ (plus la valeur de CI₅₀ est petite plus l'activité antiradicalaire est importante).

- .2. Le pouvoir réducteur du fer (FRAP)**

Matériel et méthode

.2.1. Principe

Le pouvoir réducteur du fer a été utilisé pour évaluer la capacité de l'extrait à réduire le Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La lecture a été effectuée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**).

.2.2. . Mode opératoire :

Dans une microplaque à 96 puits, nous avons mélangé 10 μL de chaque extrait à différentes concentrations (50 à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avec 40 μL du tampon phosphate (0,2 M/ pH 6,6) et 50 μL de solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %). Après incubation à 50 °C pendant 20 min, nous avons ajouté 50 μL d'acide trichloroacétique (TCA, 10%), 40 μL d'eau distillée et 10 μL de la solution de FeCl_3 (0,01%).

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif à différentes concentrations (10 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). L'absorbance du blanc a été lue à 700 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer).

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait. Les résultats sont exprimés en CE_{50} (concentration de l'extrait qui correspond à une absorbance égale à 0,5) et sont calculés graphiquement pour chaque extrait à partir de l'équation de la courbe linéaire.

2.3. Piégeage de l'ABTS

2.3.1. Principe

L'activité de piégeage du radical du 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) a été évaluée selon la méthode décrite par **Re et al., (1999)**.

Le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est produit par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. Ce changement se traduit par l'apparition d'une coloration bleu vert intense. La présence d'un antioxydant permet le passage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en forme non radicalaire et ça se traduit par la disparation de cette coloration. La lecture a été effectuée à 734 nm (**Re et al 1999**).

2.3.2. Mode opératoire

Le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a été préparé en mélangeant l'ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (2,45 mM) en solution aqueuse. La solution mère d'ABTS a été conservée à l'obscurité pendant 16 h avant l'utilisation puis dilué par l'eau distillée jusqu'à obtenir une absorbance entre 0.7-0,75 à 734 nm. Nous avons ajouté ensuite 160 μL de cette solution à 40 μL d'extraits de différentes concentrations. Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Enspire Perkin

Matériel et méthode

Elmer). L'acide ascorbique a été utilisé comme un contrôle positif à des concentrations allant de 20 à 200 µg/ mL.

Le pourcentage de réduction a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'ABTS (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

La CI_{50} pour chaque extrait a été calculée graphiquement à partir de la courbe logarithmique du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé. Elle correspond à la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire de 50% du radical ABTS.

3. Etude de la corrélation

L'analyse de la corrélation est une mesure statistique qui exprime la notion de lien linéaire entre deux variables.

Le coefficient de Pearson a été calculé pour la mesure le niveau de corrélation entre les deux variables (les quantités en polyphénols, flavonoïdes, tanins et les trois méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante). Il renvoie une valeur entre -1 et 1. S'il est proche de 1 cela signifie que les variables sont corrélées, proche de 0 que les variables sont décorrélées et proche de -1 qu'elles sont corrélées négativement.

Résultats et interprétation

Résultats et interprétation

1. Rendement des extractions :

Deux types d'extraction des feuilles et tiges de *Melissa officinalis* ont été réalisés : l'extraction sous reflux pendant 1 h et l'extraction par macération pendant 72 h. Les solvants utilisés sont : eau/ méthanol (30/70) et chloroforme.

Les différents rendements ont été calculés à partir de la matière végétale sèche de la plante étudiée et sont représentés dans la figure 18.

D'après les résultats, les meilleurs rendements sont obtenus avec les extraits bruts reflux. L'extrait hydrométhanolique sous reflux a montré le rendement le plus élevé (5,82%). Tandis que l'extrait chloroformique a exhibé un rendement faible (2%).

Pour l'extraction par macération, l'extrait hydrométhanolique a montré un rendement plus élevé (4,67%) par rapport l'extrait chloroformique (1,5%).

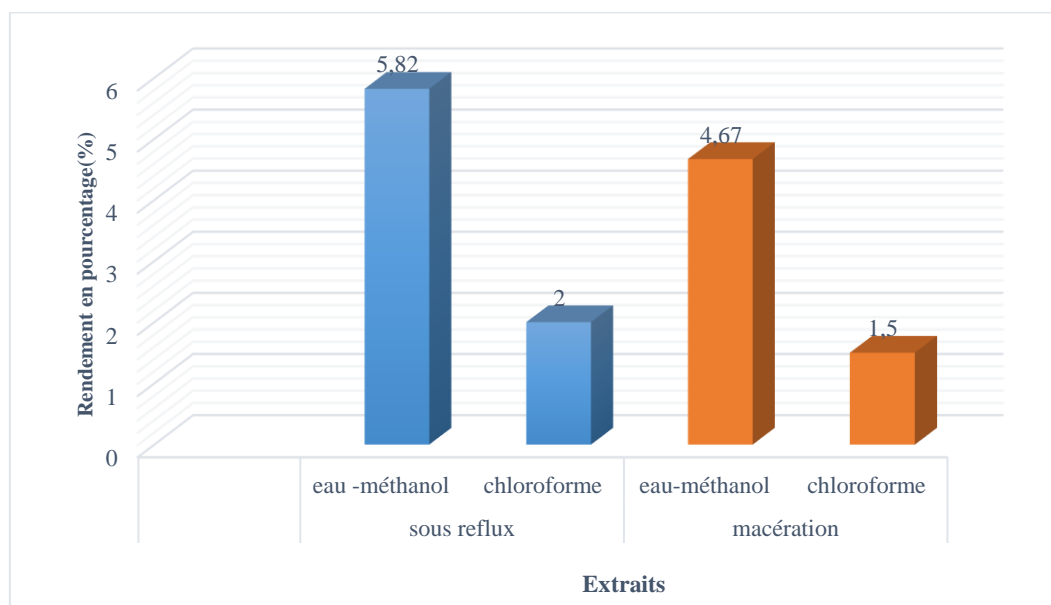


Figure 18 : Rendements des deux extraits de *Melissa officinalis*

2. Les tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits hydrométhanoliques et chloroformiques des deux types d'extraction sont regroupés dans le tableau 3

Nous constatons la présence des flavonoïdes, des tanins et des saponines dans les extraits hydrométhanoliques des deux types d'extraction sous reflux et macération par contre ils sont absents dans les extraits chloroformiques. Les alcaloïdes, terpénoïdes et les sucres réducteurs sont présents dans tous les extraits étudiés.

Les composés les plus abondants dans les extraits étudiés sont : les alcaloïdes (par le test de wagner), terpénoïdes et les sucres réducteurs.

Les tests de recherche des quinones et anthraquinones sont négatifs dans nos extraits.

Résultats et interprétation

Tableau 3 : Résultats des tests phytochimiques des extraits de *Melissa officinalis*

Familles chimiques		Extraction sous reflux		Extraction par Macération	
		Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique	Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-	-
	Wagner	+++	+++	+++	+++
Composés phénoliques	Flavonoïdes	+	-	+	-
	Tanins	+++	-	+++	-
	Quinines	-	-	-	-
Anthraquinones		-	-	-	-
Saponines		+	-	++	-
Terpénoïdes		+++	+	+++	+
Sucres réducteurs		+++	++	+++	++

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : Test négatif

3. Dosage des métabolites secondaires

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *Melissa officinalis* ont été calculés en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe $y=0,0016x$ (figure 19). Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) et sont regroupés dans le tableau 4.

Les résultats montrent qu'il y a une faible différence entre les polyphénols des extraits obtenus par extraction sous reflux et macération de *Melissa officinalis*. En effet, l'extrait brut hydrométhanolique obtenue par extraction sous reflux et macération a montré une teneur de l'ordre de $179,37 \mu\text{g}$ EAG / mg d'extrait et $117,5 \mu\text{g}$ EAG / mg d'extrait respectivement. Ces résultats sont légèrement plus élevés que ceux obtenus par l'extrait chloroformique ($134,37 \mu\text{g}$ EAG/ mg d'extrait, $93,75 \mu\text{g}$ EAG/ mg respectivement).

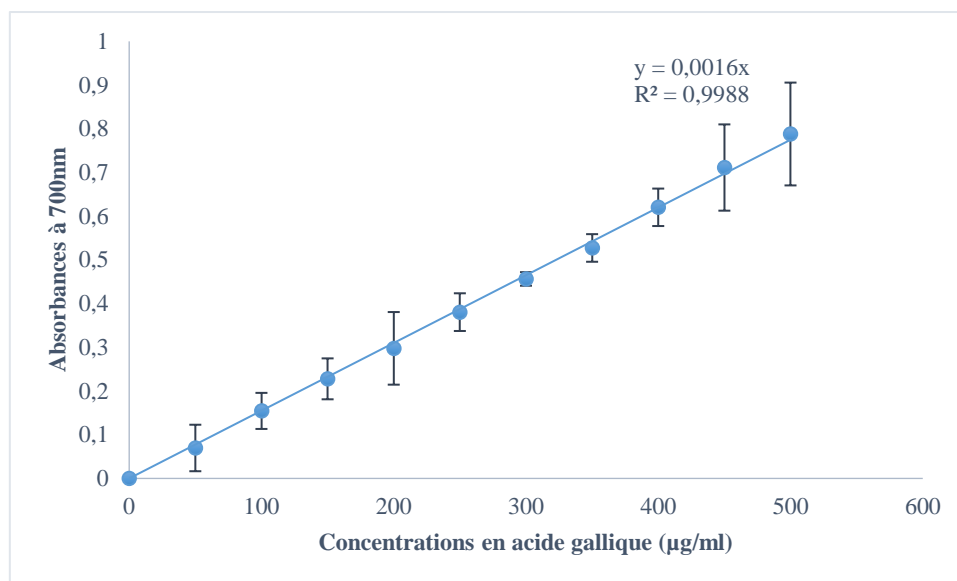


Figure 19 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

Tableau 4 : Les teneurs en polyphénols totaux en µg EAG/ mg d'extrait.

Mode d'extraction	Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique
Sous reflux	179,37	134,37
Macération	117,5	93,75

3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits sont obtenues en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,0027x$ (figure 20).

Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E) et sont regroupés dans le tableau 5.

Nous constatons qu'il y a une légère différence entre les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de *Melissa officinalis*.

La meilleure teneur en flavonoïdes totaux a été obtenue par l'extrait hydrométhanolique sous reflux (110,74 µg EC/mg E) alors que la plus basse teneur a été obtenue par l'extrait chloroformique par macération (50 µg EC/ mg E).

Résultats et interprétation

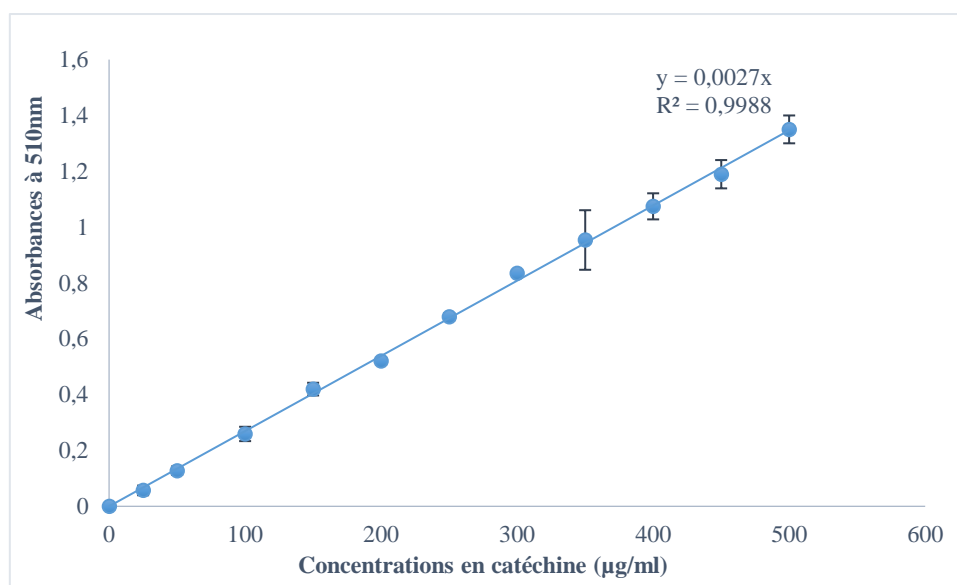


Figure 20 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

Tableau 5 : Les teneurs en flavonoïdes totaux en µg EC/ mg d'extrait

Mode d'extraction	Extrait	
	hydrométhanolique	chloroformique
Sous reflux	110,74	87,03
macération	94,07	50

3.3. Dosage des tanins condensés

Les teneurs des tanins condensés dans les différents extraits de *Melissa officinalis* sont obtenues en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,0002x$ (figure 21).

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E) et sont représentées dans le tableau 6.

A partir des résultats, on remarque que les teneurs en tanins condensées dans les extraits chloroformiques (pour les deux modes d'extraction) sont supérieures à celle des extraits hydrométhanoliques.

Ces teneurs peuvent être classés dans l'ordre suivant : extrait chloroformique obtenue par extraction sous reflux (1970,5 µg EC/mg E) > extrait chloroformique obtenue par extraction par macération (1366µgEC/mg E) > extrait hydrométhanolique obtenue par extraction sous reflux (275µgEC/mg E) >extrait hydrométhanolique acquis par extraction par macération (229,5µgEC/mg E).

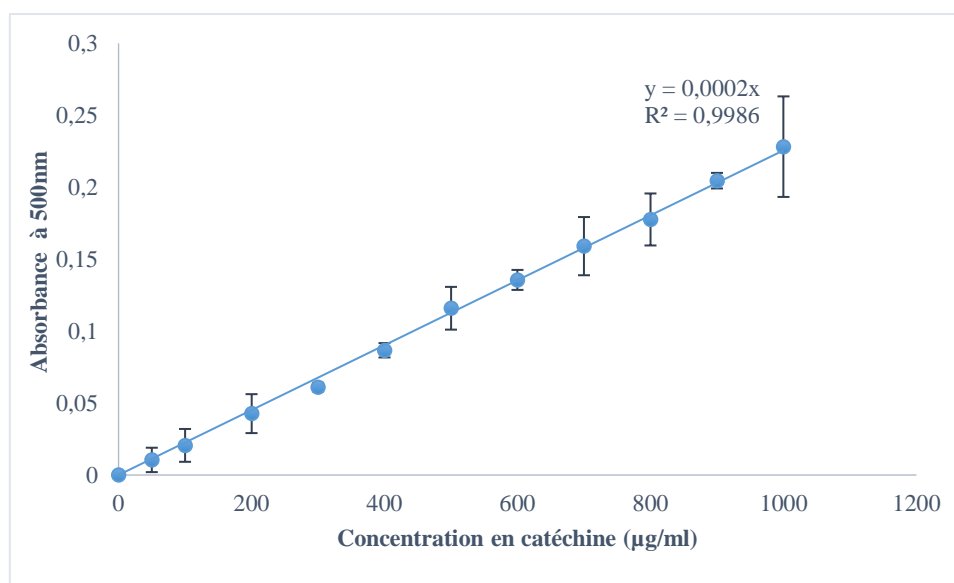


Figure 21 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

Tableau 6 : Les teneurs en tanins condensés en µg EC/ mg d'extrait

Mode d'extraction	Extrait hydro-méthanolique	Extrait chloroformique
Sous reflux	275	1970,5
macération	229,5	1366

4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de *Melissa officinalis* a été évaluée par trois méthodes différentes : Piégeage du radical libre DPPH, pouvoir réducteur du fer (FRAP) et piégeage d'ABTS.

4.1. Piégeage du radical libre DPPH

Cette méthode permet de tracer des courbes logarithmiques qui expriment des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits ainsi que le contrôle positif : acide ascorbique (figure 22). A partir des résultats obtenus nous avons déterminé les CI_{50} de chaque extrait (tableau 7).

Nous constatons que les CI_{50} des extraits obtenus par extraction sous reflux sont relativement élevées dans les extraits obtenus par macération. En effet, l'extrait hydrométhanolique présente une capacité à réduire le radical libre la plus importante avec une CI_{50} de $856,17 \pm 14,06 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction sous reflux et $1296,6 \pm 8,74 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction par macération, suivi par l'extrait brut chloroformique ($1500 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$ pour extraction sous

Résultats et interprétation

reflux et $2072 \pm 6,62 \mu\text{g/mL}$ pour extraction par macération). Les valeurs des CI_{50} de *Melissa officinalis* restent élevées par rapport à celles du standard acide ascorbique ($CI_{50}=68,44 \pm 12,23 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 7 : Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de *Melissa officinalis*

	Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique
Sous reflux	$856,17 \pm 14,06$	$1500 \pm 8,6$
Macération	$1296,6 \pm 8,74$	$2072 \pm 6,62$
Le standard : Acide ascorbique	$68,44 \pm 12,23$	

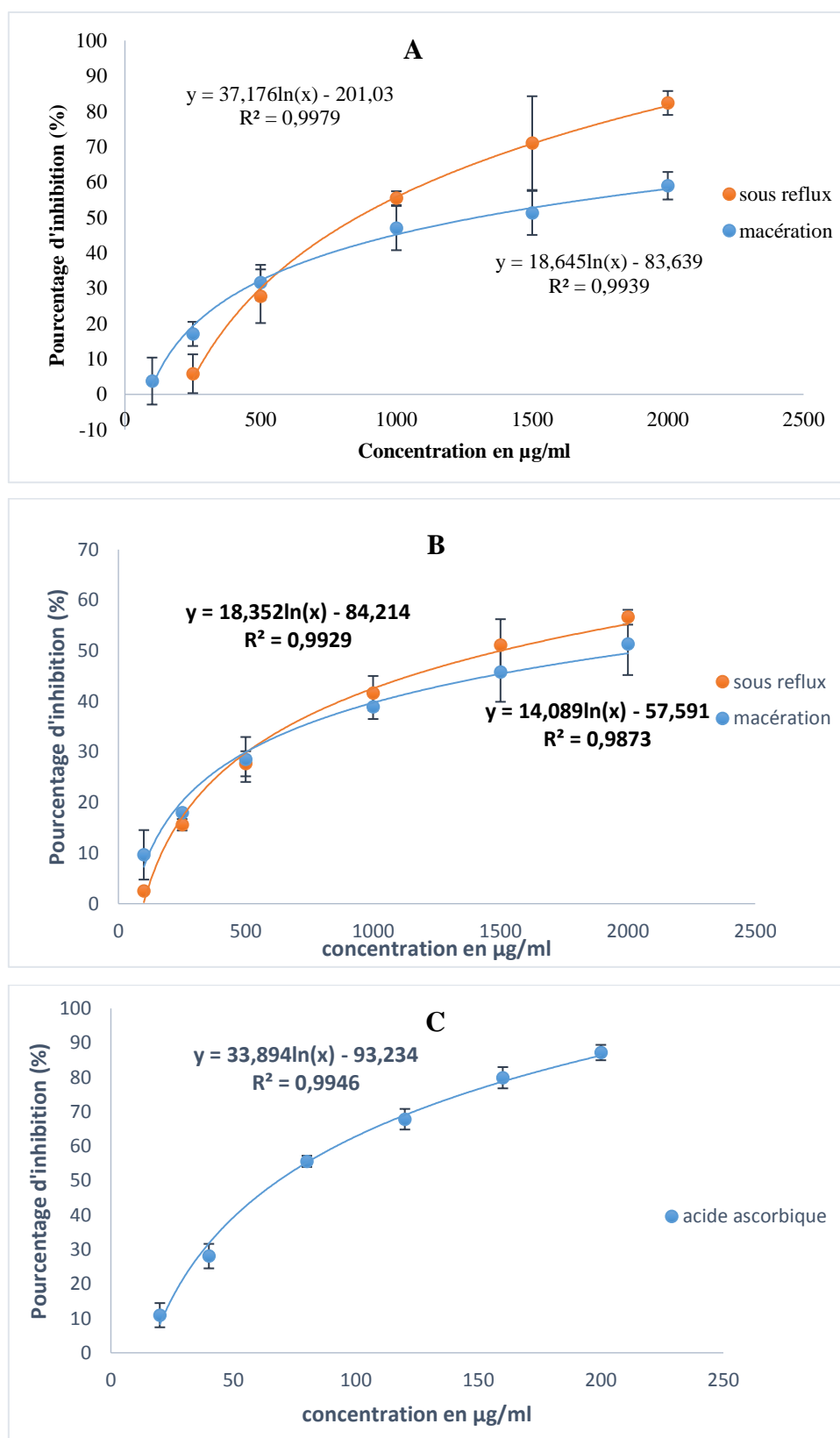


Figure 22 : Pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Melissa officinalis* et standard. A : extrait hydrométhanolique, B : extrait chloroformique, C : le standard.

Résultats et interprétation

4.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP

Cette technique est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

A partir des résultats obtenus, nous avons tracé des courbes linéaires qui expriment les absorbances en fonction des concentrations des extraits de *Melissa officinalis* et le standard (figure 23). Selon les absorbances obtenues, nous avons calculé les CE_{50} pour chaque extrait préparé ainsi que l'acide ascorbique. Les résultats sont illustrés dans le tableau 8.

Nous remarquons que la réduction du fer est proportionnelle avec les concentrations des extraits. En effet les extraits hydrométhanoliques ont montré le pouvoir le plus élevé à réduire le fer ($1021 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ pour extraction sous reflux et $1260,25 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ pour extraction par macération) par rapport aux extraits chloroformiques qui ont présentés une activité relativement faible ($1677,66 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ pour extraction sous reflux et $1744 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ pour extraction par macération).

Les valeurs des CE_{50} restent très éloignées de celles obtenues avec l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique ($138,28 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 8 : Les CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de *Melissa officinalis*.

	Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique
Sous reflux	$1021 \pm 0,14$	$1677,66 \pm 0,09$
Macération	$1260,25 \pm 0,11$	$1744 \pm 0,09$
Le standard : Acide ascorbique	$138,28 \pm 0,14$	

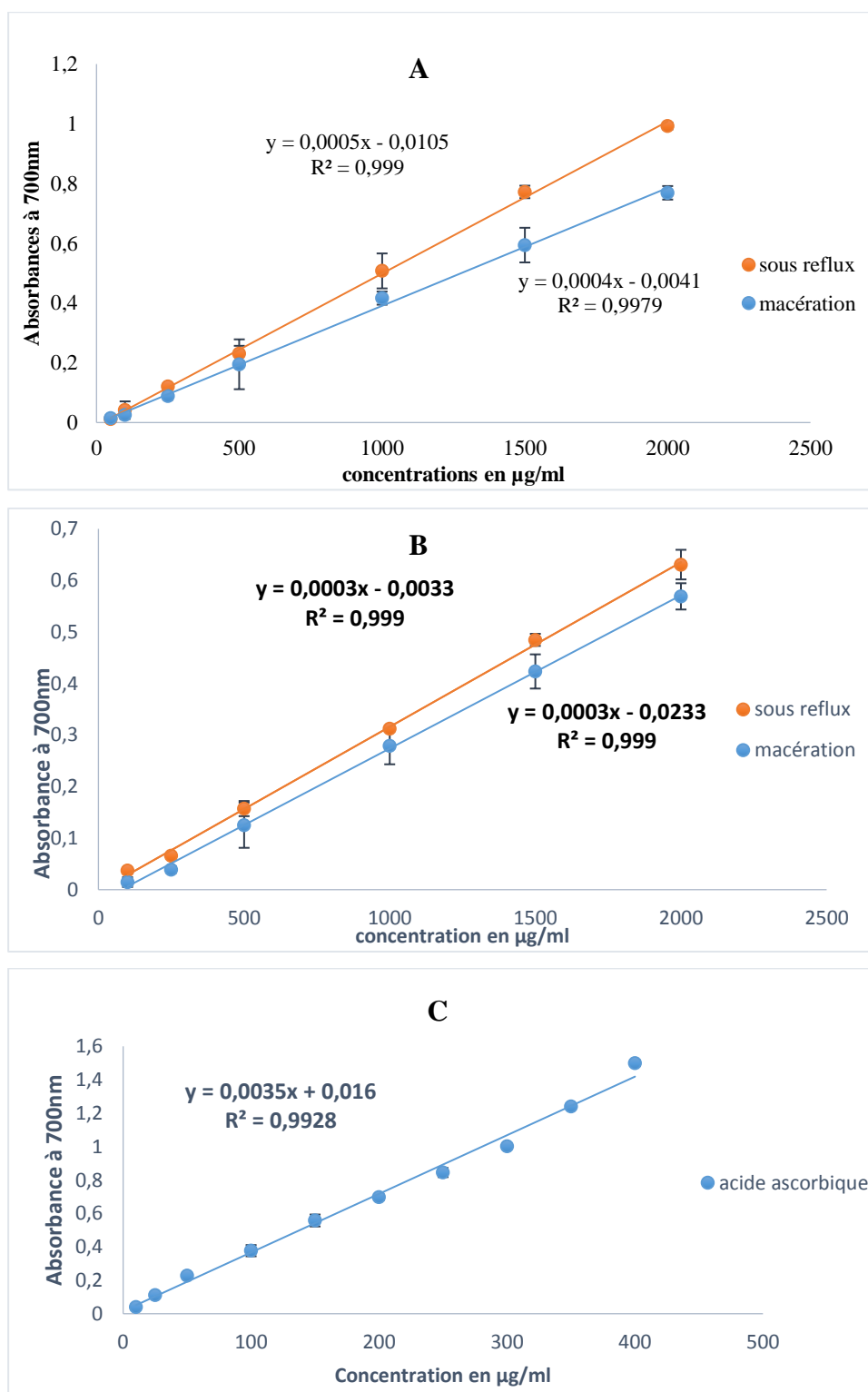


Figure 23 : Evolution des absorbances en fonction des concentrations des extraits de *Melissa officinalis* et le standard. A : extrait hydrométhanolique, B : extrait chloroformique, C : le standard.

Résultats et interprétation

4.3. Piégeage de l'ABTS

L'ABTS est un radical plus réactif et plus polyvalent que le DPPH qui permet le transfert des électrons grâce à sa solubilité dans l'eau et même dans les solvants organiques. Il permet l'évaluation de l'activité de piégeage des extraits hydrophiles et lipophiles (Gülçin, 2012).

A partir des résultats obtenus, nous avons tracé des courbes logarithmiques qui expriment les pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits ainsi que le contrôle positif : acide ascorbique (Figure 24).

Nous constatons qu'il y a une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits et de contrôles positif. A partir de ces résultats, nous avons calculé les valeurs des concentrations nécessaires pour réduire 50% du radical libre ABTS (CI_{50}). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 9.

D'après les résultats, nous observons que la meilleur CI_{50} a été obtenue par l'extrait hydrométhanolique sous reflux suivi par la macération. Les extraits chloroformiques ont montré des valeurs plus élevées.

L'acide ascorbique, a montré une valeur beaucoup plus basse que par rapport à nos extraits ($61,36 \pm 16,58 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 9 : Les CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents extraits de *Melissa officinalis*

	Extrait hydrométhanolique	Extrait chloroformique
Sous reflux	$253,26 \pm 14,24$	$414,11 \pm 12,98$
Macération	$335,08 \pm 15,71$	$509,56 \pm 11,49$
Le standard : Acide ascorbique	$61,36 \pm 16,58$	

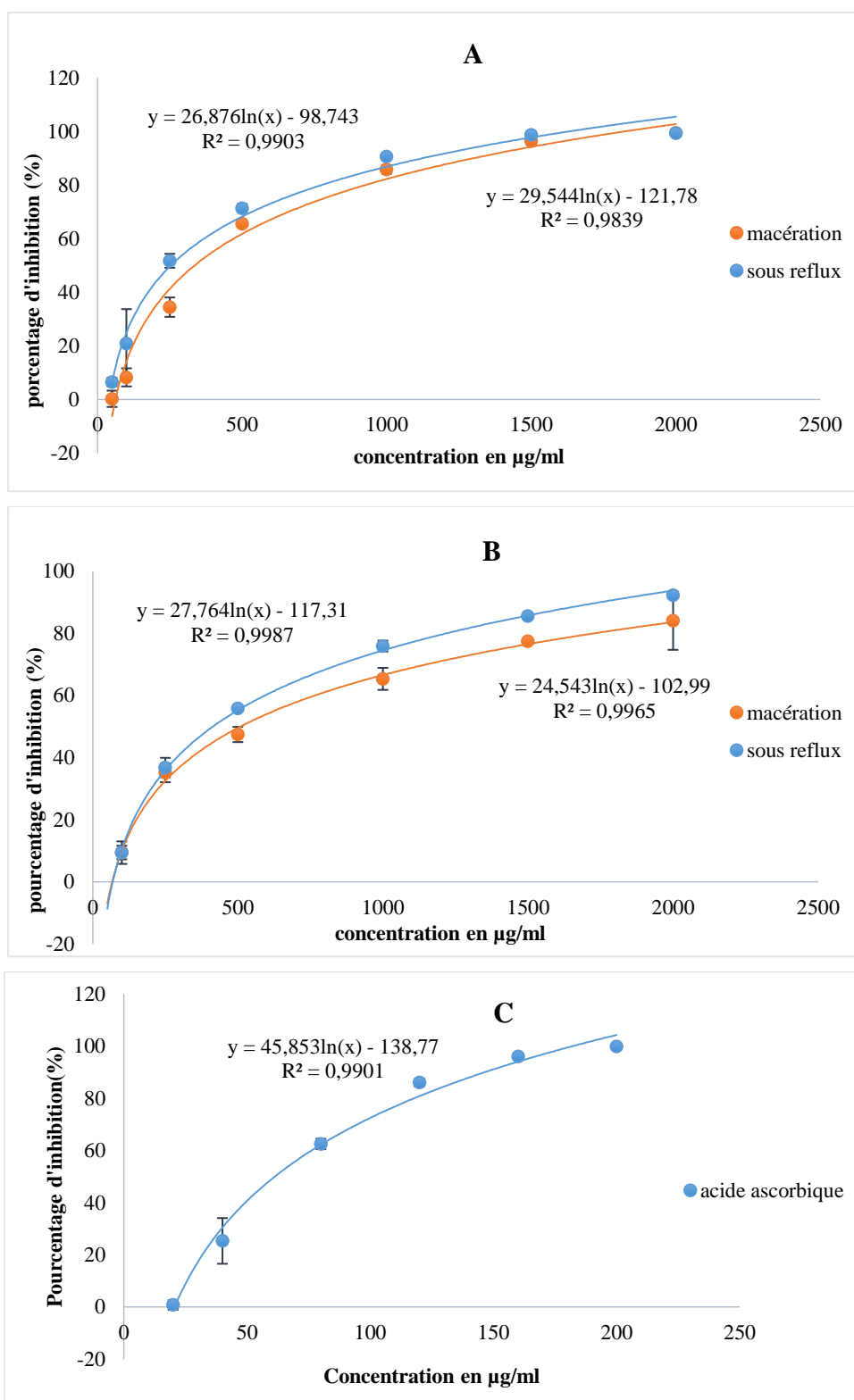


Figure 24 : Evolution des pourcentages d'inhibitions du radical libre ABTS en fonction des concentrations des extraits de *Melissa officinalis* et standard. A : extrait hydrométhanolique, B : extrait chloroformique, C : le standard

Résultats et interprétation

5. L'étude de corrélation :

La corrélation permet d'étudier la relation entre les différents composés phénoliques et la capacité antioxydante de la plante *Mélissa officinalis*.

Le tableau 10 montre une forte corrélation positive entre les différentes quantités des composés phénoliques et le pouvoir réducteur ferrique, DPPH et ABTS, ainsi entre la quantité des polyphénols et les flavonoïdes.

Une forte relation inversement proportionnelle entre les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes totaux et la capacité à réduire les radicaux libres DPPH et ABTS.

De plus, il est présenté une faible corrélation inversement proportionnelle entre les tanins et la quantité des polyphénols et des flavonoïdes.

Tableau 10 : La corrélation entre les différents composés phénoliques et la capacité antioxydante

	Quantité PP	Flavonoïdes	Tanin	CI 50	EC50	ABTS
Quantité PP	1					
Flavonoïdes	0,87467	1				
Tanin	-0,377716	-0,554145	1			
CI 50	-0,906834	-0,986640	0,63552	1		
EC ₅₀	-0,758875	-0,850770	0,885849	0,913240	1	
ABTS	-0,861189	-0,964617	0,736217	0,990377	0,958792	1

Discussion générale

Discussion générale

Les plantes médicinales représentent la source la plus riche en molécules bioactives qui sont utilisées dans divers domaines tel que : le domaine pharmaceutique, cosmétique, thérapeutique et alimentaire.

Les médicaments à base de plantes peuvent avoir moins d'effets secondaires que les médicaments synthétiques s'ils sont bien utilisés (**Ang et al., 2019 ; Chandran et al., 2020**). *Melissa officinalis* est l'une de ces plantes médicinales.

L'objectif de ce travail est la recherche des composés bioactifs présent dans la partie aérienne (feuilles-tiges) de *Melissa officinalis* ainsi que l'étude de l'activité antioxydante de quatre extraits différents.

L'extraction des parties aériennes de *Melissa officinalis* a été réalisée par deux techniques différentes : l'extraction sous reflux sous agitation pendant 1h (extraction à chaud) et l'extraction par macération pendant 72 h (extraction à froid) en utilisant deux solvants de polarités différentes : eau/méthanol et chloroforme afin de connaître le solvant qui permet la meilleure extraction des métabolites secondaires car il est évident que la polarité des solvant influence directement sur la nature des métabolites secondaires présents dans les extraits.

Les résultats des rendements obtenus dans notre étude varient entre 1,5% et 5,82%. Les extraits hydrométhanoliques ont montré les rendements les plus élevés. Ces pourcentages sont légèrement inférieurs par rapport aux ceux cités par **Boudjema et al., (2021)** qui ont fait des études sur la même espèce de la région d'Ain el Hammam, Tizi Ouzou (Algérie) et ils ont enregistré un rendement de 7,79% pour l'extrait méthanolique . Dans une autre étude, **Bounihi, (2015)** a récolté la même plante du Maroc et a signalé un rendement de l'ordre de 16,5% pour l'extrait aqueux. Un rendement d'extraction de 16,1% a été obtenu par **Adimi (2014)** qui a récolté la plante de la région de Sétif (Algérie).

Selon certains auteurs, les rendements varient selon plusieurs critères : le matériel végétal utilisé, la période et la région de récolte, la méthode d'extraction et les conditions de séchage la polarité du solvant utilisé ainsi la solubilité des composés phénoliques dans ce solvant (**Keskes et al., 2014, Daoudi et al., 2015**).

Les tests phytochimiques nous ont permis de détecter la présence ou l'absence des principaux composés chimiques présents dans la partie aérienne de *Melissa officinalis*. Ces tests ont révélé une présence moyenne des flavonoïdes, tanins et saponines dans les extraits hydrométhanoliques et une présence totale des alcaloïdes, terpénoïdes et les sucres réducteurs dans tous les extraits. De plus, notre plante est caractérisée par l'absence des quinones et anthraquinones. Ces résultats sont confirmés par **Bounihi, (2015)** qui a enregistré la présence moyenne des flavonoïdes et des saponines et d'autre part les alcaloïdes et les stérols qui sont

Discussion générale

fortement présents. **Mutalib, (2014)** a mentionné la présence des saponines et les terpénoïdes ainsi que **Boudjema et al., (2021)** ont rapporté la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des tanins et des composés réducteurs en grande quantité tandis que les saponines, les coumarines et les triterpènes étaient présents en petite quantité.

Cette différence peut être expliquée par l'âge de la plante, la variation climatique et la période de récolte (**Boudjema et al., 2021**).

L'étude quantitative des extraits de *Melissa officinalis* avait pour but de déterminer la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés. Les extraits hydrométhanoliques ont montré des teneurs plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes par contre les extraits chloroformiques possédaient des teneurs plus élevées en tanins condensés.

D'après les résultats de **Bounihi (2015)**, l'extrait brut aqueux renferme les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs de 23,53 mg EAG /mg E et 16,4 mg EC/mg E respectivement. L'extraction a été effectuée par le mélange de la poudre fine de *Melissa officinales* avec l'eau distillée et le chauffage à ébullition pendant 20min.

Les travaux des **Sassoui et al., (2022)** sur la même plante de la région de Msila ont montré que l'extrait éthanolique renferme une teneur en polyphénol égale à 1,875 mg EAG/g E et un taux des flavonoïdes qu'est de l'ordre de 7,5mg EC/g E.

Cependant, il est difficile de comparer nos résultats trouvés avec les autres travaux à cause de plusieurs facteurs tel que la méthode et la durée d'extraction et le solvant d'extraction utilisé ce qui diminuent la fiabilité de comparaison entre les résultats (**Trabelsi et al., 2010**).

Les composés phénoliques sont à l'origine de plusieurs activités biologiques. Parmi ces activités nous avons l'activité antioxydante (**Alvarez-Jubete et al., 2010**). Ceci nous a donc poussés à nous intéresser à l'évaluation de cette activité via trois tests différents : piégeage de DPPH, le test de FRAP et le piégeage de l'ABTS.

Nous avons observé que les extraits hydrométhanoliques possèdent les meilleurs pouvoirs inhibiteurs du radical libre DPPH avec une CI_{50} de $856,17 \pm 14,06 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction sous reflux et $1296,6 \pm 8,74 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction par macération par rapport aux extraits chloroformiques. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par **Boudjema et al., (2021)** qui ont enregistré une valeur de $830 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis*. Cependant, nos résultats sont différents de ceux rapportés par **Romaiana et al., (2008)** qui ont travaillé sur la même espèce et ont trouvé une valeur de CI_{50} d'environ $483 \mu\text{g/mL}$.

Albayrak et al., (2013) et **Miraj et al., (2016)** ont testé la capacité antioxydante des extraits méthanoliques de *Melissa officinalis*, et ont enregistré des résultats très intéressants avec des

Discussion générale

valeurs de CI_{50} de l'ordre de 20,16 $\mu\text{g/mL}$ et 48,76 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. De même **Bounihi (2015)** a trouvé une CI_{50} égale à 32,36 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait aqueux.

Concernant la méthode de FRAP, les résultats obtenus ont montré que les extraits hydrométhanoliques ont une bonne capacité à réduire le fer avec une EC_{50} de $1021 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction sous reflux et $1260,25 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ pour l'extraction par macération. Nos résultats sont nettement supérieurs par rapport aux de travaux de **Bounihi (2015)** qui a enregistré une activité intéressante au test antioxydant via le test FRAP ainsi que les travaux de **Koksal et al., (2011)** qui ont montré que l'extrait aqueux présente une forte capacité à réduire le fer avec un EC_{50} de 30 $\mu\text{g/mL}$.

L'évaluation de la capacité antioxydante par le piégeage d'ABTS donne des résultats intéressants que les autres tests car le radical ABTS est plus réactif que le radical DPPH.

Les résultats obtenus montrent que les extraits hydrométhanoliques possèdent des valeurs plus basses de CI_{50} par rapport les extraits chloroformiques. Ces CI_{50} sont supérieurs à celle obtenus par l'extrait aqueux rapportée par **Bounihi (2015)** qui a trouvé une CI_{50} de 54,27 mg TE/g.

L'étude de corrélation montre une forte relation entre la teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et les dosages du pouvoir réducteur ferrique, piégeage des radicaux DPPH et ABTS ce qui explique une meilleure activité à réduire les radicaux libres dans les extraits de *Mélissa officinalis* puisqu'ils sont très riches en composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes.

Ces résultats sont confirmés par **Youla et Latrous, (2017)** qui ont utilisés la technique de séparation des extraits brute méthanoliques et éthanologiques par la chromatographie sur couche mince (CCM) et ils ont montré que la plante contient des flavonoïdes en quantité importante : flavonone, flavonol, méthoxyflavane.

De plus, **Feknous et ses collaborateurs, (2013)** ont été utilisés la Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM) pour l'identification et la caractérisation de quelque métabolites secondaires des huiles essentiels de la Mélissa (*Mélissa officinalis*) et ils ont trouvés la présence de : Néral (Citral b), (-) - oxyde de caryophyllene, Bergamotene et Citronellyl acétate. Ces constituants majoritaires qui caractérisent cette HE peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs notamment les conditions de stockage et le mode d'extraction (**Feknous et al., 2013**).

Enfin, les corrélations obtenues quantitativement confirment le parallélisme entre la quantité de polyphénols et les flavonoïdes et les trois méthodes utilisées pour l'évaluation de 'l'activité antioxydante. Ces activités antioxydantes sont donc dues à la présence de composés

Discussion générale

phénoliques et flavonoïdes présent dans nos extraits (**Fenglin *et al.*, 2004**). L'activité antioxydante des composés phénoliques dépend de la structure, en particulier du nombre et de la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique (**Balasundram *et al.*, 2006**). En fait, plusieurs études ont rapporté une corrélation directe entre l'activité antioxydante et le pouvoir réducteur des composants végétaux (**Yildirim *et al.*, 2001**). Le niveau de corrélation entre la teneur en phénols et l'activité antioxydante est un aspect intéressant, mais il faut tenir compte du fait que les composés phénoliques répondent différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques qu'ils possèdent, et que la teneur totale en phénols n'intègre pas nécessairement tous les antioxydants pouvant être présents dans un extrait (**Tawaha *et al.*, 2007**).

En général, les polyphénols avec un grand nombre de groupes hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée et la plus intéressée (**Heim *et al.*, 2002**). Ils sont capables de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Torres de Pinedo *et al.*, 2007**), ce qui peut être expliqué par le nombre, la position et la nature des substituants (groupes hydroxyle, méthoxylé, glycosylé) sur les cycles B et C et du degré de polymérisation (**Popovici *et al.*, 2010**). Par conséquent, l'effet antioxydant n'est pas non seulement dépendant de la dose mais aussi dépendant de la structure (**Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2010**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Actuellement, et malgré l'évolution de la pharmacologie, l'usage des plantes médicinales en thérapeutique est très présent dans certains pays du monde grâce à leurs richesses en composants bioactifs et qui représente une alternative dans le traitement de diverses pathologies comme le cancer, les maladies métaboliques et neurodégénératives.

Notre recherche s'inscrit dans le cadre de l'exploitation des ressources naturelles, et nous sommes appuyés sur la détermination des propriétés phytochimiques et l'évaluation des activités antioxydantes des extraits hydrométhanoliques et chloroformiques des feuilles et tiges de *Melissa officinalis* de l'Algérie.

A travers les résultats obtenus dans ce travail, nous pouvons conclure que :

- Les extractions successives sous reflux et macération, par deux solvants organiques de polarité opposés (eau/méthanol : polaire, chloroforme : apolaire) ont montré un rendement considérable par le solvant le plus polaire, hydrométhanolique sous reflux (5,82%).
- L'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des terpénoïdes et des composés réducteurs en quantités importantes dans les extraits de *Melissa officinalis*. Cependant, il y a moins flavonoïdes, les tanins et les saponines dans les extraits hydrométhanoliques.
- L'analyse quantitative de l'extrait hydrométhanolique des feuilles et tiges de *Melissa officinalis* obtenue par l'extraction à chaud et à froid, présente les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux (179,37 µg EAG / mg E, 117,5 µg EAG / mg E respectivement), en flavonoïdes totaux (110,74 µg EAG / mg E, 94,07 µg EAG / mg E respectivement). Tandis que l'extrait chloroformique présente le teneur le plus élevée en tanins condensés, sous reflux (1970,5µg EC/mg E) et macération (1366µg EC/mg E).
- L'extrait hydrométhanolique sous reflux a montré la meilleure capacité à réduire le radical libre DPPH avec une IC_{50} de $0,856 \pm 0,014$ mg/ml suivi par l'extrait hydrométhanolique par macération (IC_{50} de $1,296 \pm 0,008$ mg/ml).
- Les deux autres méthodes FRAP et ABTS ont montré que l'extrait hydrométhanolique sous reflux est toujours le plus actif.
- La présence des polyphénols totaux et les flavonoïdes en quantité importante dans l'extrait l'hydrométhanolique peut indiquer la présence d'une activité antioxydante de la plante.

Conclusion et perspectives

Tous ces résultats obtenus sont encore préliminaires et ne constituent que la première phase de la recherche, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour compléter ce travail :

- ✚ Utiliser d'autres solvant pour extraire le maximum des métabolites secondaires.
- ✚ Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes tel que : ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).
- ✚ L'isolement et l'identification des substances naturelles (principe actif) responsables des activités antioxydantes par des techniques chromatographiques et spectrales.
- ✚ Etudier la toxicité de cette plante.
- ✚ Evaluation de l'activité antioxydante in vitro sur des cultures cellulaires : des cellules isolées des tissus de l'organisme vivant pour confirmer les résultats obtenus.
- ✚ Des études in vivo de molécules bioactives isolées sont nécessaires pour identifier les tissus et organes cibles et pour étudier leurs mécanismes d'action aux niveaux tissulaire et moléculaire.
- ✚ Etudier autres activités biologiques : antidiabétique, antibactérienne, anticancéreuse et anti-inflammatoire et d'autre....

Références bibliographiques

Références bibliographique

1. **Yildirim A., Mavi A., and Kara A.A., (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, ” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 49, no. 8, pp. 4083–4089.
2. **Achour F & Bougaci C. (2008).** Contribution à l'étude ethnobotanique dans la région d'EL Hamdania et caractérisation chimique de la mélisse (*Melissa officinalis.L*) et évaluation de son effet sédatif de la mélisse. Mémoire d'Ingénieur. USDB.38p
3. **Adimi LZ. (2018).** Contribution à l'étude des effets antimicrobiens et antioxydants d'une plante médicinale : la Mélisse (*Melissa officinalis*). Thèse de Doctorat, Université de Sétif, Algérie, 203p.
4. **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4): 324-329.
5. **Aires A., Marques E., Carvalho R., Rosa E.A.S., Saavedra M.J. (2013).** Evaluation of biological value and appraisal of polyphenols and glucosinolates from organic baby-leaf salads as antioxidants and antimicrobials against important human pathogenic bacteria. *Molecules*, 18: 4651- 4668.
6. **Albayrak S., Aksoy A., Albayrak S., and Sagdic O, (2013).** In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iran. J. Sci. Technol* ; 4: 1-9.
7. **Ali M., Abbasi B.H. (2013).** Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products*, 49, 400-406.
8. **Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E. (2010).** Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.*; 119: 770-778.
9. **Ang A.M.G., Enot M.M., Baltazar G.J.D., Alinapon C.V., Buncales E.O., Barbosa G.B. (2019).** Antioxidant and Cytotoxic Activity of the Leaf Ethanolic Extracts of *Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium* from Bukidnon, Philippines. *AJBLS*; 8: 8-15.
10. **Aniszewski, T. (2007).** Elements of Applied Botany. Socrates/Erasmus Programme. Warsaw University. [in polish]. Joensuu: Joensuu University Press.110
11. **Arora A., Sairam R. et Srivastava G.(2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82: 1227-1238
12. **Aruoma O.I. (2003).** Methodological considerations for characterizing potentialAntioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mutation Research*, 9(20): 523 - 524.

Références bibliographique

13. **Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P** (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*; 89 : 27–36.
14. **Azzi R.** (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse de doctorats, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
15. **Baba aissa F,**(1999). Encyclopédie des plantes utiles : flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Librairie moderne Rouïba. Alger.368p
16. **Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W.** (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2): 342-344
17. **Balasuriya B.N., Rupasinghe H.V.** (2011). Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*, 5:172-188.
18. **Bardeau F,** 2009 : La pharmacie du BON DIEU. Edition Fernand Lanore.333p
19. **Bartels A.** 1998 : Guide des plantes du bassin méditerranéen. Edition Eugen Ulmer.400p
20. **Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H.** (2009). Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(5): 2211-2218.
21. **Beaudeau J-L, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, Legrand A.** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Ann Pharm Françaises* 2006, 64:373–381.
22. **Belaich R., Boujraf S.** (2016) . Facteurs inflammatoires et stress oxydants chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutique. *Médecine des maladies Métabolique*, 10(1) :8-42.
23. **Beloued A.** (2001). Plantes médicinales d'Algérie.OPU Algérie.192p.
24. **Benayad, N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Research Project. University of Sciences, Rabat (Maroc), pp 59.
25. **Benkhighe O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H.,Rochdi A., Allal Douira** (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *J Acta Bot Barc* 53:191-216. 9.

Références bibliographique

26. **Bensakhria A.** (2018). Toxicologie Générale : Le stress oxydatif. Chapitre IX, p 70-86.
27. **Bianchini F & Corbetta F.** 1975 : Atlas des plantes médicinales. Edition Nathan. 243p
28. **Bock B,** (2010).: Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. Tela Botanica. BDNFF v4.02. (<http://www.tela-botanica.org>).
29. **Boudjema K., Nahoui N., Temmimi K., Azine K., Hali L., Fazouane F.** (2021). Screening phytochimique et activités biologiques d'extrait méthanolique obtenu à partir de la plante *Melissa officinalis* L. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 8(1), 1-10.
30. **Boullard B.** 2001 : Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Edition Estem. 636p.
31. **Bounihi A,** 2015. Criblage phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentharotundifolia* (Lamiacées). El Djadida (Maroc). Thèse de doctorat, Université de médecine et de pharmacie. Rabat, 133p
32. **Bourgeois L,** 2007 : Le grand livre des plantes aromatiques. Editions Rustica Fler, Paris. 191p.
33. **Bruneton J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3e éd. France : Tech & Doc – Lavoisier ;
34. **Bruneton J.** (2009). Pharmacognosie-Phytochimie : plantes médicinales. Edition médicales internationales Tec & Doc. Paris 4 : 1292.
35. **Chae S.C., Lee J. H., Park S. U.** (2013). Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities.
36. **Chakraborty I., Sanjoy Kunti S., Bandyopadhyay M., Dasgupta A., Chattopadhyay G. D., Chakraborty S.** (2007). Evaluation of serum zinc level and plasma sod activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2): 109-113.
37. **Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K.** (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.*; 26:e00450.
38. **Chaouche T.M.** (2015). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr belkaid Tlemcen.
39. **Cowan MM.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbial. Rev.*; 12 (4) 564 – 582

Références bibliographique

40. **Cushnie TPT, Hamilton VES, Chapman DG, Taylor PW, Agneau AJ**, (2007). Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1562-1567.
41. **Daoudi A., Sabiri M., Bammou M., Zair T., Ibijbijen J., Nassiri L.** (2015). Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens L.*, *Urtica membranacea Poiret* et *Urtica pilulifera L.* *Journal of Applied Biosciences*, (87):8094- 8104.
42. **De Marchi E., Baldassari F., Bononi A., Wieckowski M., Pinton P.** (2013). Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66shc and protein Kinase C. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013: 1-11.
43. **Defraigne J.O. et Pincemail J.** (2008). Stress oxydant et antioxydants. *Revue Médicale Liège*.63 :10-19.
44. **Delattre J., Beaudoux L., Bonnefont-Rousselot D.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant :oxydation des acide aminés et les orotéins .Lavoisier édition TEC DOC .*médicinale internationels* , paris ,405
45. **Donatien K.** (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Malliennes–Extraction Identification d’alcaloïdes –Caractérisation, Quantification de polyphénols : Etude de leur Activité Antioxydant. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université Paul Verlaine de METZ–UPV-M. France. 2009. Page: 24,65.
46. **Duncan T., Ibrahim F., Michael G., Yuichiro J.** (2014). The role of antioxidants in the era of cardio-oncology, *cancer chenothe pharmacol* .72(6) :1157-1168.
47. **Eddouks M., Ouahidi L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A.** (2007). L’utilisation des Plantes Médicinales Dans Le Traitement Du Diabète. *Phytothérapie*. 5 :194–203.
48. **Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO.** (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afric J Biotech.*; 4 : 685 – 688.
49. **Favier A.** (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *Actualité en Chimie*, 108-115
50. **Favier A.**, (2006). Stress oxydant et pathologies humaine. *Annales pharmaceutique francaises* ; 64:(6), 390-396.
51. **Feknous S, Saidi F, Ramdhane M** (2013). Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis L.*). *Revue « Nature & Technologie »*. A- Sciences fondamentales et Engineering. Pages 07 à 13.

Références bibliographique

52. **Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL,** 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. *Phytochemistry*, 70(5): 621-627.
53. **François N.** (2010). Identification De Polyphenols, Evaluation De Leur Activite Antioxydante Et Etude De Leurs Proprietes Biologiques. Thèse de doctorats Université Paul Verlaine-Metz.
54. **Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N,** 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2): 354-361.
55. **Garait B.** (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de doctorat en biologie cellulaire, Université Joseph Fourier-France.
56. **Gilly G,** 2005 : Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à Grasse (botaniqueculture – chimie- production et marché). Edition L'harmattan, Paris.404p.
57. **Girre L.**2001 : Les plantes et les médicaments (l'origine végétale de nos médicaments) Edition Nathalie, Paris.253p.
58. **Guetens G., De Boeck G., Highley M., van Oosterom A., Ernst A.** (2002), Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Clinical Laboratory Sciences*, 39(4,5): 331–457.
59. **Guignard JL.** (1996). Biochimie végétale. Paris, France : Masson.
60. **Gülçin I,** 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3): 345-391.
61. **H. Fenglin, L. Ruili, H. bao, and M. Liang,** “Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants,” *Fitoterapia*, vol. 75, no. 1, pp. 14–23, 2004.
62. **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P.** (2007).Le stress oxydatif. *Revue Médicale Liège* ; 62 : 628-638.
63. **Harborne, J.B.** (1998). *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Technique of Plant Analysis.* 3rd Edition, Chapman and Hill, London, 285.
64. **Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J.** (2002). Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572 – 584.
65. **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 1 : 3 – 6.

Références bibliographique

66. **Hernandez-ochoa I.r.** (2005). Substitution De Solvants Et Matières Actives De Synthèse Par Combiné (Solvant/Actif) D'origine Végétale. Thèse De Doctorat. P238.
67. **Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A Cassidy A.** (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1), 38-50.
68. **Iserin P.** (2001) - Encyclopédie des plantes médicinales. Ed.Larousse-Bordas, Paris : 275 .
69. **Iserin P.** 1997 : Encyclopédie des plantes médicinales (identification, préparation, soins). Larousse- Bordas, 335p.
70. **Ito C, Itoigawa M, Onoda S, Hosokawa A, Ruabgrungsi N, Okuda T, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H,** (2005). Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry*, 66(5): 567-572.
71. **Iwueke AV., Nwodo OFC.,** (2008). Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri*. 20: 63 - 70.
72. **Jorek N.** 1983 : Epices et plantes aromatiques (description, culture, soins, propriétés et emploi de 50 aromates culinaires). Edition Hatier.123p
73. **K. Tawaha, F. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, and T. Elelimat,** “Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species,” *Food Chemistry*, vol. 104, no. 4, pp. 1372–1378, 2007.
74. **Kalam S., Singh R., Mani A., Patel J., Naem Kf., Pandey A.** (2012) .Antioxidants : elixir of life. International Multidisciplinry *Research Journal*, 1 :18-34.
75. **Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugb uaja VO.**Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien*. 2004 ; 4 : 179 – 182.
76. **Kaushal N., Kudva A.K.** (2013). Oxidative stress and inflammation: "the lesser of two evils" in carcinogenesis. *Journal of Postdoctoral Research* 1(2): 89-101.
77. **Keskes H., Mnafgui K., Hamden K., Damak M., Elfeki A., Allouche N.** (2014). « In vitro antidiabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea*L. Leaves fromTunisia », *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2:649-655
78. **Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H.** (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds.*Molecules* 18: 2328-2375.

Références bibliographique

79. **Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, Balajee A,** (2010). Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Fungal Biology*, 114(10): 817-824.
80. **Kohen R., Nyska A.** (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30:620-650.
81. **Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R.**(2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*; 33: 2-16.
82. **Kubata BK, Nagamune K, Murakami N, Merkel P, Kabututua Z, Martin SK, Kalulug TM, Mustakuk H, Hoshida M, Ohnishi-kameyama M, Kinoshita T, Duszenko M, Uradea Y,** (2005). Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology*, 35(1): 91-103.
83. **Kusano C. et Ferrari B.** (2008). Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and Molecular Biology*, 7(1): 1-1
84. **Le Cren F,** (2004). les antioxydants, la révolution du XXIe siècle, 2eme édition.
85. **Luthria D. L., Mukhopadhyay S., Krizek D.T.** (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* ; 19: 771-777.
86. **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*.
87. **Majob F, Kamalinejab M, Ghaderi N, Vahidipour HR** (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res.*; 77 – 82.
88. **Mansour S.** (2015). Evolution de l'effet anti-inflammatoire de trois médicinales *Artemisia obsitinthuimL, Artemisia herba alba Asso,* et *hypericum scarboides*. Etude *in vivo*. Thèse de doctorat Unio Mohamed Boudiaf, Oran.
89. **Marvin E,** (2005). Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie*, 3(6): 271-273
90. **Mccarthy A.L., C O'Callaghan Y., Neugart S., O Piggott C., Connolly A., Jansen A., Krumbein A., Schreiner M., FitzGerald R., O'Brien N.**(2013). The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers'spent Grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSGas Antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry*, 141: 2567-2574.

Références bibliographique

91. **Mezouar D.** (2013). Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris*. Mémoire de Magister université Abou Bekr belkaid Tlemcen, p76.
92. **Mima A.** (2013). Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: New Insights on Its Inhibition as New Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*, 1-8.
93. **Miraj M., Azizi N., Kianif S,** 2016. A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. *Der Pharm. Lett*, 8(6):229-237
94. **Mokhtarzadeh A., Eivazzadeh-Keihan R., Pashazadeh P., Hejazi M., Gharaatifar N., Hasanzadeh M., Baradaran B., Guardia M** (2017). Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus, 97 : 445-457.
95. **Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H** (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant : A review, 4(25) : 2753-2759.
96. **Muanda F.** (2010). Identification de polyphénols évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86.
97. **Mutaib L.Y,** 2015. Physicochemical, phytochemical and biological study of *Melissa officinalis* growing naturally in Kurdistan Region, Iraq: comparative study: 66-72.
98. **N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman,** "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chemistry*, vol. 99, no. 1, p. 191, 2006.
99. **Okuda T., Ito H.** (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules* 16: 2191-2217.
100. **Oldham KM, Bowen PE,** 1998. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Diet Association*, 98(9): 1001-1008.
101. **Oloyede OI.** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pak J Nutr.* 2005 ; 4 : 379 – 381.
102. **Omodonisi I., Aboua Y., Oguntibeju G.** (2017). Assessment of Anti-Hyperglycaemic, Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa oleifera* in Diabetes – induced Nephrotoxic Male Wistar Rats.
103. **Oyaizu M,** 1986. Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6) : 307-315.
104. **Pandey K., Rizvi S.** (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2(5): 270 – 278.

Références bibliographique

105. **Penchev P-I**, 2010 : Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.229p.
106. **Peronny S.** (2005) La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. *Discipline Eco-Ethologie* ;151.
107. **Perret.** (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par botrytis cinerea. Thèse de doctorat. Université de neuchâtel. Suisse. p184.
108. **Petrisor, G.; Motelica, L.; Craciun, L.N.; Oprea, O.C.; Fikai, D.; Fikai, A.** (2022). Melissa officinalis: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review, 23, 3591.
109. **Pizza V., Iorio E., Capasso A.** (2013). Parkinson's disease and oxidative stress: evaluation by BAP and d- ROMs tests. *Pharmacologyonline* 1: 34-38.
110. **Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M,** (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited.
111. **Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib.** (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1– 8.
112. **Quezel P et Santa S**, 1962 : Nouvelles flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. Paris : centre nationale de la recherche scientifique.1170p.
113. **Rahtiyarca Bagdat R & Cosge B.** (2006). The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis L.*), its components and using fields. *J. of Fac of Agric., OMU*, 21(1): 116-121.
114. **Rakotonanahary M.** (2012). Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état. Université Joseph Fourier, pp 16, 19, 27, 28.
115. **Ramasubramania R.** (2012). Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview , 6(03) : 203-213.
116. **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*; 26: 1231-1237.
117. **Rodriguez-Bernaldo, A. Q. F. S., Frecha, P. A., Vidal., & Lopez, H. J.** (2010). Antioxydant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology*, 231 (3), 495 – 498
118. **Romaiana P.P and Roselei F,** (2008). Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*. *Matricaria recutita* and *Cymbopogon Citratus*.

Références bibliographique

119. **Ronat N.** (2001) LA MELISSE (MELISSA OFFICINALIS L.). Thèse de doctorats, Université Joseph Fourier Faculté De Pharmacie De Grenoble.
120. **Sadiya N., Roohi Z** (2013). An Overview of Badranjboya (*Melissa officinalis*) , 2(12) : 107-109
121. **Sassoui H., Ladjal Y., Yousfi L.** (2022). Contribution à la valorisation phytochimique des plantes médicinales locales : *Melissa officinalis* L. et *Daphne gnidium* L. Mémoire de Master académique. Université Mohamed Boudlef-M'sila. p 98.
122. **Sebai, M., et Boudali, M., (2009/2012).** La phytothérapie a la confiance et mefiance, Institut de formation paramédical CHETTIA.
123. **Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., Nacro M.** (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des Sciences*, 10 (2) : 24-32.
124. **Sherbrook** (2003). La mélisse, Guide de production biologique p16.
125. **Shin M., Yang H., Ki H.** (2013). Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
126. **Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF,** 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5) : 421-426.
127. **Speck B, Ursula & Fotsch C.** 2009 : Connaissance des herbes. EGK-caisse de Santé.pp4
128. **Srikrishna D., Godugu C., Dubey P.K.** (2018). Review on Pharmacological Properties of Coumarins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(2):113-141.
129. **Sun B, Richardo-da-Silvia JM, Spranger I,** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(10) : 4267-4274.
130. **Torres De Pinedo, A., Pen alver, P., & Morales, J. C.** (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chem*, 103, 55–61.
131. **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C** (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
132. **Traber G., Atkinson J.** (2007). Vitamine E, antioxydant et rien de plus. *Free Radical Biology and Medicine*, 43 : 4-15.

Références bibliographique

133. **Tsao R.** (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
134. **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1. 40.
135. **Vergani L., Floreani M., Russell A., Ceccon M., Napoli E., Cabrelle A., Valente L., Bragantini F., Leger B., Dabbeni-Sala F.** (2004). Antioxydant defences and homeostasis of reactive oxygen species in differnt humen mitochondrial DNA depletion cell lines. *European journal of biochemistry*, 271:3646-3656.
136. **Vermeris W., Nicholson R.** (2006). Isolation and identification of phenolic compounds biochemistry, published by Springer, Dordrecht, pp 35-62-151-191.
137. **Wolff, S. P., Bascal, Z. A., and Hunt, J. V.** (1989). "Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Progress in clinical and biological research* **304**, 259-75.
138. **Youla A, Latrous I** (2017) : Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes chez l'espèce (*Melissa Officinalis* L.) et évaluation de leur pouvoir antibactérien. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine.
139. **Yves N , (2008)**. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de doctorat. Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
140. **Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W.** (2007). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999; 64: 555 – 559. In: Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food Chem Toxicol.*; 45 : 2402 – 2411.

Annexes

Annexes

1. Le rendement :

Solvants	Rendements (%)		
	Méthode d'extraction	Eau- méthanol	chloroforme
<i>Mélissa officinalis</i>	Sous reflux	5,82	1,5
	macération	4,67	2

2. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et les tanins condensés :

3.2. Dosage des polyphénols totaux

C (µg/ml)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
DO	0	0,1105	0,1545	0,2017	0,3428	0,3805	0,4564	0,4909	0,6898	0,6657	0,6818
	0	0,089	0,1120	0,2540	0,4183	0,3804	0,4363	0,5273	0,6203	0,8629	0,7678
	0	0,0095	0,0720	0,2951	0,2524	0,3058	0,4299	0,4644	0,6984	0,7569	0,9144

Les extraits :

Extraits (1mg/ml)	Eau-méthanol		Chloroforme	
	Sous reflux	macération	Sous reflux	Macération
DO	0.2835	0.1890	0.15	0.2148
	0.3060	0.1841	0.1507	0.2165
	0.2702	0.1899	0.1477	0.2132

3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

4.

C(µg/ml)	0	25	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
DO	0	0.0808	0.1276	0.2921	0.4198	0.4964	0.6757	0.8342	0.7312	0.9754	1.1179	1.3002
	0	0.05	0.0952	0.2562	0.4721	0.5197	0.6644	0.8373	0.9773	1.0712	1.2296	1.3999
	0	0.0403	0.0948	0.2295	0.4294	0.5205	0.6953	0.8573	0.9304	1.0775	1.2209	

Les extraits :

Extraits (1mg/ml)	Eau-méthanol		Chloroforme	
	Sous reflux	macération	Sous reflux	Macération
DO	0.3676	0.1121	0.2042	0.1397
	0.2929	0.1503	0.2555	0.1315
	0.2371	0.2588	0.2479	0.3183

2.3. Dosage des tanins condensés

C(µg/ml)	0	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
DO	0	0.0022	0.0054	0.0392	0.0611	0.0867	0.0862	0.1356	0.1742	0.1858	0.2122	0.3031
	0	0.0213	0.0235	0.0281	0.0660	0.0839	0.1159	0.1201	0.1930	0.1694	0.2004	0.3015
	0	0.0188	0.0329	0.0607	0.0683	0.0750		0.1339	0.1439	0.1420	0.2011	0.2282

Les extraits :

Extraits (5mg/ml)	Eau-méthanol		Chloroforme	
	Sous reflux	macération	Sous reflux	Macération
DO	0.0587	0.0457	0.3622	0.2511
	0.0660	0.0119	0.4223	0.2619
	0.0404	0.0803	0.3980	0.3068

3. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Le piégeage de radical libre DPPH

Acide ascorbique :

C(µg/ml)	20	40	80	120	160	200	Contrôle
DO	0.4978	0.4606	0.2339	0.1823	0.0735	0.062	0.5858
	0.4664	0.4426	0.2303	0.2172	0.1045	0.0862	0.5727
	0.5336	0.4164	0.257	0.1901	0.1164		0.5907

Extrait hydrométhanolique :

- Sous reflux (2mg/ml)

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.6241	0.6373	0.6769	0.4629	0.3048	0.1231	0.0588	0.6292
	0.6416	0.6346	0.6032	0.4691	0.2853	0.1307	0.1130	0.6406
	0.6856	0.6084	0.6306	0.5642		0.3032	0.0851	0.6306

- Macération (2mg/ml)

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.55	0.61	0.46	0.44	0.3	0.27	0.25	0.59
	0.62	0.56	0.51	0.36	0.32	0.3	0.23	0.58
	0.56	0.52	0.58	0.47	0.21	0.22	0.21	0.52

Annexes

Extrait chloroformique :

- Sous reflux (2mg/ml)

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.601	0.5902	0.5102	0.4369	0.3646	0.2559	0.2505	0.5763
	0.5873	0.5868	0.5002	0.4172	0.3703	0.3352	0.2731	0.6306
	0.5641		0.5176	0.4555	0.3221	0.294	0.2615	

- Macération (2mg/ml)

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0,5376	0,5445	0,4696	0,4367	0,3665	0,3528	0,3276	0,5763
	0,5622	0,5207	0,5191	0,4475	0,3703	0,3324	0,2733	0,6292
	0,5565	0,571		0,4086		0,2952	0,2798	

4.2.Pouvoir réducteur du fer FRAP

Acide ascorbique :

C(µg/ml)	10	25	50	100	150	200	250	300	350	400
DO	0,0454	0,1038	0,2323	0,3961	0,5322	0,706	0,7674	1,005	1,0628	1,512
DO	0,0342	0,108	0,2474	0,3972	0,5428	0,7054	0,8638	0,9762	0,9388	1,5291
DO		0,122	0,2226	0,3386	0,5986	0,6783	0,8256	0,9984	1,4152	1,4873

Extrait hydrométhanolique :

- Sous reflux :

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000
DO	0,0045	0,0079	0,1297	0,2549	0,4661	0,7944	0,9711
DO	0,019	0,0629	0,11	0,2346	0,5489	0,7683	0,9843
DO		0,0535	0,1215	0,2034	0,5917	0,7531	1,0009

- Macération

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000
DO	0,01	0,027	0,085	0,254	0,407	0,635	0,753
DO	0,015	0,023	0,098	0,136	0,432	0,553	0,454
DO	0,018	0,026	0,08	0,103	0,401	0,626	0,785

Extrait chloroformique :

Sous reflux :

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000
DO	0,015	0,036	0,058	0,146	0,316	0,48	0,642
DO	0,008	0,038	0,07	0,174	0,309	0,476	0,652
DO	0,01	0,013	0,062	0,152	0,298	0,498	0,598

Macération :

C(µg/ml)	50	100	250	500	1000	1500	2000
DO	-0.01	0,018	0,04	0,094	0,25	0,452	0,551
DO	0.012	0,004	0,032		0,319	0,431	
DO	0.0009	0,022	0,045	0,156	0,268	0,387	0,587

Annexes

4.3. Piégeage d'ABTS

Acide ascorbique :

C($\mu\text{g/ml}$)	20	40	80	120	160	200	contrôle
DO	0,711	0,482	0,267	0,098	0,023	0,001	0,703
DO	0,733	0,582	0,253	0,085	0,033	0,003	0,74
DO	0,703	0,62	0,268	0,102	0,025	0	0,721

Extrait hydrométhanolique :

- Sous reflux (2mg/ml)

C($\mu\text{g/ml}$)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.677	0.572	0.343	0.2	0.069	0.009	0.006	0.738
	0.687	0.732	0.344	0.208	0.065	0.009	0	0.729
	0.696	0.437	0.377	0.222	0.071	0	0.002	0.735

- Macération (2mg/ml)

C($\mu\text{g/ml}$)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.713	0.659	0.493	0.242	0.105	0.016	0.003	0.703
	0.707	0.644	0.473	0.251	0.096	0.033	-0.001	0.74
	0.72	0.656	0.46	0.243	0.085	0	-0.002	0.721

Extrait chloroformique :

- Sous reflux (2mg/ml)

C($\mu\text{g/ml}$)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.679	0.65	0.447	0.325	0.192	0.108	0.052	0.738
	0.695	0.65	0.486	0.321	0.165	0.099	0.062	0.729
	0.695	0.697	0.459	0.327	0.174	0.112	0.058	0.735

- Macération (2mg/ml)

C($\mu\text{g/ml}$)	50	100	250	500	1000	1500	2000	Contrôle
DO	0.668	0.642	0.432	0.389	0.215	0.169	0.111	0.703
	0.672	0.652	0.498	0.383	0.276	0.162	0.119	0.74
	0.642	0.666	0.474	0.365	0.259	0.159	0.002	0.721

الملخص

المركبات الطبيعية المستخلصة من النباتات لها استعمالات مختلفة في التكنولوجيا الحيوية، في المستحضرات الطبية والتجميلية والمواد الغذائية. من بين هذه الجزيئات، نجد غالبية المواد الثانوية التي يتضح استعمالها في العديد من المجالات حتى في العلاج. مع وضع ذلك في الاعتبار، سعينا في هذا العمل إلى التأثير المضاد للأكسدة في المختبر لأربعة مستخلصات من الجزء الجوي من نبات ميليسا (*Melissa officinalis*) للاستخدام المحتمل في مجال الأدوية أو الأغذية الزراعية.

تم إعداد أربعة مستخلصات باستخدام منبئين (الهيدروميثانول والكلوروفورم) ووضعين مختلفين للاستخراج (البارد والارتجاع). تم إجراء الاختبارات الكيميائية النباتية باستخدام تقنيات تستند إلى تغيير اللون والترسيب والتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية. تم تحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويد والعص المكثف من المستخلصات الأربعة بواسطة تقنيات قياس الطيف. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طرق تعتمد على نقل الإلكترون المفرد (DPPH و ABTS) ونقل ذرة الهيدروجين (FRAP).

أظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي تم إجراؤه على الجزء العلوي لميليسا وجود فلوينويدات وترينويدات والسكريات المرجعة بكميات كبيرة، كما كشف عن وجود كميات أقل من التانينات والفلافونويد والصابونين.

أشار التحليل الكمي للمركبات الفينولية إلى وجود محتويات كبيرة من البوليفينول والفلافونويد في مستخلصات الهيدروميثانول تحت الارتجاع حيث قدرت ب 179,37 ميكروغرام معادل لحمض الغاليك/ملغ من المستخلص و 110,74 ميكروغرام معادل لحمض الكاتشين/ملغ من المستخلص على التوالي. والعص المكثف في مستخلص الكلوروفورم تحت الارتجاع (1970,5 ميكروغرام معادل لحمض الكاتشين/ملغ من المستخلص).

أظهرت قدرة مضادات الأكسدة لمستخلص الهيدروميثانول تحت الارتجاع أهمية كبيرة في اختبارات إزالة الجذور الحرة DPPH و ABTS $253,26 \pm 14,24$ ميكروغرام / مل، $856,17 \pm 14,06$ ميكروغرام / مل على التوالي مقارنة بمستخلص الكلوروفورم $414,11 \pm 12,98$ ميكروغرام / مل، $1500 \pm 8,6$ ميكروغرام / مل على التوالي. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل ثراء ميليسا في الجزيئات الكيميائية التي يمكن أن تمثل مصدرًا جديدًا للمواد النشطة بيولوجيًا في العلاج. الكلمات المفتاحية: ميليسا، المستخلصات الخام، مركبات ثانوية، مركبات فينولية، نشاط مضاد للأكسدة.

Résumé

Les composés naturels d'origine végétale présentent des intérêts très recherchés dans la biotechnologie, industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Parmi ces molécules, on trouve une majorité des métabolites secondaires qui sont illustrés dans nombreux domaines même en thérapie. Dans cette optique, nous avons recherché dans ce travail l'effet antioxydant in vitro de quatre extraits de la partie aérienne de la plante *Melissa officinalis* pour une éventuelle utilisation dans le domaine pharmacologiques ou agroalimentaire.

Quatre extraits ont été préparé en utilisant deux solvant (hydrométhanol et chloroforme) et deux modes d'extraction (à froid et sous reflux) différents. Les tests phytochimiques ont été réalisés par techniques basées le changement de couleur, la précipitation et la visualisation sous lumière ultra-violette. Les Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins condensés des quatre extraites ont été effectués par des techniques spectrophotométriques. L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'électron singulier (DPPH et ABTS) et le transfert d'atome d'hydrogène (FRAP).

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie aérienne de *Melissa officinalis* a montré la présence des alcaloïdes, terpénoïdes et les sucres réducteurs en quantité importante. Il a révélé aussi des quantités plus faibles en tanins, flavonoïdes et des saponines.

L'analyse quantitative des composés phénoliques a indiqué la présence des teneurs considérables en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits hydrométhanolique sous reflux ($179,37 \mu\text{g EAG} / \text{mgE}$ et $110,74 \mu\text{g EC} / \text{mgE}$ respectivement) et en tanins condensés dans l'extrait chloroformique sous reflux ($1970,5 \mu\text{g EC} / \text{mg E}$).

Le potentiel antioxydant de l'extrait hydrométhanolique sous reflux s'est montré très intéressant avec les tests de piégeage des radicaux libres ABTS et DPPH ($\text{CI}_{50} = 253,26 \pm 14,24 \mu\text{g/mL}$ et $\text{CI}_{50} = 856,17 \pm 14,06 \mu\text{g/mL}$ respectivement) par rapport l'extrait chloroformique ($\text{CI}_{50} = 414,11 \pm 12,98 \mu\text{g/mL}$ et $\text{CI}_{50} = 1500 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$ respectivement).

Les résultats obtenus dans ce travail révèlent la richesse de *Melissa officinalis* en biomolécules qui pourraient représentés une nouvelle source de substances bioactives en thérapeutique.

Mots clés : *Melissa officinalis*, extraits bruts, métabolites secondaires, composés phénoliques, activité antioxydante.

Abstract

Natural compounds from plant are of high interest and are requested in biotechnology, and in the pharmaceutical, food and cosmetic industries. Among these molecules, we find a majority of secondary metabolites that are illustrated in many fields even in therapy. In this context, in this work we researched the *in vitro* antioxidant effect of four extracts of the aerial part of the *Melissa officinalis* plant for possible use in the pharmacological or agro-food field.

Four extracts were prepared using two different solvents (hydromethanol and chloroform) and two extraction methods (cold and under reflux). The phytochemical tests were carried out by techniques based on color change, precipitation and visualization under ultraviolet light. The assay of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins of the four extract were carried out by spectrophotometric techniques. The antioxidant activity was evaluated by methods based on singular electron transfer (DPPH and ABTS) and hydrogen atom transfer (FRAP).

The qualitative phytochemical examination carried out on the aerial part of *Melissa officinalis* showed the presence of alkaloids, terpenoids and reducing sugars in large quantities. It also revealed lower amounts of tannins, flavonoids and saponins.

Quantitative analysis of phenolic compounds indicated the presence of considerable contents of polyphenols and flavonoids in the hydromethanolic extracts under reflux ($179,37 \mu\text{g EAG} / \text{mgE}$ and $110,74 \mu\text{g EC} / \text{mgE}$ respectively) and condensed tannins in the chloroform extract under reflux ($1970,5 \mu\text{g EC} / \text{mg E}$).

The antioxidant potential of the hydromethanolic extract under reflux was shown to be very interesting with the ABTS and DPPH free radical scavenging tests ($\text{IC}_{50} = 253,26 \pm 14,24 \mu\text{g/mL}$ and $\text{IC}_{50} = 856,17 \pm 14,06 \mu\text{g/mL}$ respectively) compared with chloroform extract ($\text{IC}_{50} = 414,11 \pm 12,98 \mu\text{g/mL}$ and $\text{IC}_{50} = 1500 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$ respectively).

The results obtained in this work reveal the richness of *Melissa officinalis* in biomolecules, which could represent a new source of bioactive substances in therapy.

Key words: *Melissa officinalis*, crude extracts, secondary metabolites, phenolic compounds, antioxidant activity.