

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieures et de la Recherche Scientifique

جامعة امحمد بوقرة بومرداش

Université de M'Hamed Bougara, Boumerdes



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème:

Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis L.*

Présenté par :

M^{elle} NAHOUI Nour El Houda et M^{elle} TEMMIMI Kahina

Soutenu le : 10/07/2019

devant le jury composé de :

M ^{me} HAROUZ.H	MCB	UMBB	Présidente
M ^{me} AIT KAKIA	MCA	UMBB	Examinatrice
M ^r BOUDJEMA.K	MCB	UMBB	Promoteur
M ^{me} FAZOUANE.F	Prof	UMBB	Co-promotrice
M ^{me} AZINE.K	REST	CRD, Alger	Co-promotrice

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions **ALLAH** qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous tenons à remercier notre promoteur **Mr. Boudjemaa. K**, maître de conférences classe B à l'université de Boumerdes de nous avoir proposé ce sujet et de diriger notre travail par ses précieux conseils et encouragements.

Nous exprimons nos respectueuses reconnaissances à **M^{eme} Fazouane. F**, Professeur à l'université de Boumerdes pour ses aides techniques et ses orientations.

Nos sincères remerciements vont aussi à **M^{eme} Azine. K**, Responsable du laboratoire pharmacotoxicologie de CRD Saidal (Alger), pour son accompagnement dans la réalisation de notre travail.

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail

A **M^{eme} Harouz .H**, maître de conférences classe A d'avoir accepté de présider ce jury et à

M^{eme} Ait Kaki. A, maître de conférences classe A qui a accepté de juger ce travail.

Nous tenons aussi à remercier **Dr Belkadi. A. et M^{eme} Tribech. N**, pour leurs aides techniques et leurs orientations.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ingénieure de laboratoire de Biochimie appliquée **M^{eme} Kamilia** pour ses encouragements et orientations, ainsi que tous les enseignants de Département de Biologie qui ont contribué à notre formation universitaire.

Dédicace

Je dédié ce modeste travail :

A mes chers parents

Nahoui mouhamed et Nacira

Pour tous leurs sacrifices, leurs amour, leur tendresse, leurs soutien tout au long de mes études, je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puise dieu le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et surtout le bonheur.

A mes chères sœurs *Imene, Lyna*

A mes chers frères *Salah, Amine, Akram*

A mes neveux

A mes amis *Hanane, Amel, Houda, Hadjira, Samia*

A ma binôme *kahina* et toute sa famille

A tous mes collègues de biochimie

Nour El Houda

Dédicace

Je dédié ce modeste travail :

A mes chers parents

TEMMIMI Slimane et Malika

Pour tous leurs sacrifices, leurs amour, leur tendresse, leurs soutien tout au long de mes études, je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puisse dieu le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et surtout le bonheur.

A mes chères sœurs *Mima, Nadia, Rimmel*

A mes chers frères *Yacine, Amir*

A mes cousines et amis

Doussa, Katia, Karima, Faiza, Asma, Nasserine, Oussama, Rafik et Fouad

A ma binôme *Houda* et toute sa famille

A tous mes collègues de biochimie

Dédicace spécial

A la mémoire de mon grand frère « Abdenour » qui nous à quitter trop tôt. Puisse dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

Kahina

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique de <i>Mélissa officinalis</i>	04
Tableau 02 : Exemples de classes des polyphénols	07
Tableau 03 : Répartition des lots avec leurs traitements (activité anti-inflammatoire)	23
Tableau 04 : Répartition des lots avec leurs traitements (activité sédative)	25
Tableau 05 : Résultats du screening phytochimique de la plante <i>Mélissa officinalis</i>	27
Tableau 06 : Les valeurs d'IC50	30
Tableau 07 : Pourcentage d'œdème de la patte postérieure gauche chez les souris traités par Ibuprofène et l'extrait méthanolique de <i>M. officinalis</i>	33
Tableau 08 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte postérieure gauche chez les souris traités par ibuprofène et l'extrait méthanolique de <i>M. officinalis</i>	33
Tableau 09 : Résultats de l'activité sédative.....	34

Liste des figures

Figure 01 : Plante de la mélissa officinalis (photo originale).....	02
Figure 02 : Différentes partie de Mélissa officinalis	03
Figure 03 : Squelette de la base des flavonoïdes.....	08
Figure 04 : Structure des anthocyanes.....	08
Figure 05 : Structure de l'acide gallique et de l'acide ellagique	09
Figure 06 : Structure des tanins condensés	10
Figure 07 : Biosynthèse des composés phénoliques par voie Shikimate	10
Figure 08 : Structure d'isoterpénoïde.....	12
Figure 09 : La poudre de <i>mélissa officinalis</i>	16
Figure 10 : Diagramme représentant les différentes étapes de l'étude expérimentale sur <i>M. officinalis</i>	17
Figure 11 : Préparation de l'infusé, décoctât et de l'extrait éthanolique de <i>M. officinalis</i>	18
Figure 12 : Extraction par macération.....	21
Figure 13 : Extrait sec de <i>M. officinalis</i>	21
Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	21
Figure 15 : Administration des traitements par Voie orale	23
Figure 16 : Injection de la suspension de carragénine.....	23
Figure 17 : Mesure de l'épaisseur des pattes enflammées	24
Figure 18 : Cage de plexiglas	25
Figure 19 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Mélissa officinalis</i>	31
Figure 20 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	31

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique

ACTH : Adréno Cortico Trophic Hormone

AI : Anti-Inflammatoire

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AIS : Anti-Inflammatoire Stéroïdien

BHT : Butylated hydroxytoluene

C : Concentration

Cox : Cyclo oxygénase

CRD : Centre de Recherche et de Développement

DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle

ENSA : Ecole national des sciences agronomiques

GABA: Gamma-Amino Butyric Acid

M : masse

M.o : Mélissa officinalis

Ms : Métabolite secondaire

P : Probabilité

PA : Principe actif

Rd : Rendement

S : Souris

Sx : Ecart type

T : Temps

UV : Ultra-Violet

V : Volume

Vit : Vitamine

VO : Voie orale

Table de matière

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Matière végétale

Plantes médicinales.....	2
Généralité sur la famille des lamiacées	2
Plante étudiée.....	2
<i>Mélissa officinalis</i> L	2
Description botanique de la plante	3
Nomenclature de la plante	4
Classification botanique de la plante	4
Habitat	4
Propriété thérapeutique de la plante	4
Utilisation traditionnelle de la plante.....	5

Chapitre II : Métabolites secondaires

Définition.....	6
Classification... ..	6
Composés phénoliques	6
Alcaloïdes	11
Terpènes.....	12

Chapitre III : Activités biologiques

Activité anti-oxydante	13
Types d'antioxydants.....	13
Activité anti-inflammatoire	14
Classification des agents anti –inflammatoires.....	14
III.2.1.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	14

Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	14
Anti-inflammatoire d'origine végétale	15
III.3. Activité sédative	15

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel	16
Matériel non biologique.....	16
Matériel biologique.....	16
Matériel végétal	16
Matériel animal.....	16
Préparation de la poudre végétale.....	16
II. Méthodes.....	17
Détermination de la teneur en eau	17
Screening phytochimique	18
Extraction méthanolique par macération de <i>mélissa officinalis</i>	20
Détermination du rendement d'extraction.....	21
Evaluation des activités biologiques.....	21
Activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH).....	21
• Principe.....	21
• Mode opératoire.....	22
• Expression des résultats.....	22
• Détermination d'IC50.....	22
Activité anti-inflammatoire (Test de l'œdème de la patte)	22
• Principe.....	22
• Mode opératoire.....	22
• Expression des résultats.....	24
Activité sédative	25
• Principe.....	25
• Mode opératoire.....	25
• Expression des résultats.....	25
Etude statistique.....	26
Moyennes arithmétiques.....	26
Variance et écart type	26

Chapitre II : Résultats et discussion

Détermination de la teneur en eau	27
Screening phytochimique	27
Rendement d'extraction	30
Activité antioxydante.....	31
Activité anti-inflammatoire	33
Activité sédative	34
Conclusion et perspectives.....	36

Références bibliographique

Annexes

Résumés

Introduction générale

Introduction générale

Dans le monde, les plantes ont toujours été utilisées comme médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes (**Dibong et al, 2011**).

Le recours à la médecine à base des plantes est profondément ancré dans notre culture, car l'Algérie est réputée par la richesse de sa flore médicinale qui comprend des centaines d'espèces végétales (**Akharaiyi et Boboye, 2010**). Cette matière végétale accumule des métabolites dits secondaires, ces derniers représentent une source importante de molécules à savoir les polyphénols et les flavonoïdes, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires (**Kreif, 2003**).

De ces nombreuses plantes médicinales notre étude s'est portée sur *Mélissa officinalis L.*

qui est une espèce végétale que l'on rencontre en Europe méridionale, en Afrique du nord et en Asie dans les régions humides et ombragés, possède un large spectre d'activités biologiques. Elle est très largement utilisée par les tradipraticiens, comme antioxydant, anti-cancer, antidepressant et anti-inflammatoire...

Notre étude consiste à la recherche des substances naturelles volatiles de *Mélissa officinalis* d'une part et d'autre part, d'étudier leurs activités biologiques. Le travail est subdivisé en deux grandes parties :

Une partie bibliographique; qui englobe des données théoriques sur la plante étudiée et ses substances bioactives, ainsi sur ses activités biologiques, et une partie pratique partagée en cinq étapes :

- Un screening phytochimique de la partie aérienne de *Mélissa officinalis*;
- Détermination de la teneur en eau de la plante étudié ;
- Extraction des composés phénoliques par macération ;
- Détermination du rendement d'extraction ;
- Evaluation des activités biologiques de *M. officinalis* (antioxydante, anti-inflammatoire et sédativ).

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Matière Végétale

I.1. Plantes médicinales

La majorité des populations des pays en voie de développement utilisent des espèces végétales comme médicaments. Ces derniers sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Leur utilisation a effectué un retour en force à travers différentes régions du monde (**Fleurentin et Balasard, 2002**).

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

I.2. Généralité sur la famille des lamiacées

Les lamiacées sont connues également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus au moins cosmopolites mais dans la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen tels que la Thym, la Lavande et le Romarin (**Botineau, 2010**). Dans la flore de l'Algérie, les lamiacées sont représentés par 28 genres et 146 espèces, certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces (**Quezel et Santa, 1962**).

I.3.Plante étudiée

I.3.1.*Mélissa officinalis* L.

Le nom de *Mélissa* vient du grec signifie "feuille à abeilles". La *Mélissa* est une plante dont les feuilles dégagent une odeur de citron et dont les principes actifs lui confèrent des vertus apaisantes, lui permettant de réduire les effets du stress et de dissiper les troubles digestifs d'origine nerveux, Les suppléments de *Mélissa* sont principalement utilisés en tant que calmant (**Figure 01**) (**Youla et latrous, 2017**).



Figure 1 : Plante de *Mélissa officinalis* (photo originale)

I.3.2. Description botanique de la plante

La Mélissa est une plante vivace herbacée de 30 à 80 cm de hauteur, à feuilles vert vif d'odeur citronnée (**Figure 02**). D'après **Ronat(2001)**, elle est constituée des parties suivantes :

Tiges : dressées, quadrangulaires, plus ou moins velues, peu ramifiées à la base, contrairement dans les parties hautes à la floraison.

Feuilles : simples, opposés, ovales, légèrement cordiformes, mesurant de 5 à 8 cm, dont la face supérieure est rugueuse au toucher car couvertes de poils. Les feuilles des rameaux axillaires sont plus petites.

Fleurs : la floraison a lieu de juin à septembre. Les fleurs sont blanches, rosées. Elles sont espacées le long de la tige et groupées par trois ou six à l'aisselle des feuilles supérieures et centrales.

Fruit : c'est un tétrakène de 2 mm de large. Il est constitué de 4 petits akènes ovoïdes et lisses de couleur brun foncé.



Figure 02: Différentes partie de *Mélissa officinalis* (**Girre ; 1985**)

I.3.3. Nomenclature de la plante

Selon **Goetz et Ghedirak(2012)**, les noms communs de *Mélissa* sont :

- En Français : Citronnelle, abeille, thé de France...
- En Anglais : Lemon balm, sweet balm...
- En Arabe : Turijan, تريلجان rayhan allaymun, ريحان الليمون..

I.3.4. Classification botanique de la plante

Selon **Dupond et Guignard (2007)**, la classification de *M. officinalis* est présentée dans le **Tableau 01**.

Tableau 01 : Classification botanique de *Mélissa officinalis* L.

Embranchement	Spermaphyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone vraies
Sous classe	Astéridée
Ordre	Lamiale
Famille	Lamiacée
Genre	Melissa
Espèce	<i>Melissa officinalis</i> L.

I.3.5. Habitat

Mélissa est une plante qui se trouve spontanément dans les bois, les bords de chemins. Elle est plus fréquentée dans les endroits humides et ombragés. Comme pour beaucoup d'autre lamiacées, l'aire de dispersion de la *mélisse* est extrêmement étendue, mais avec une prépondérance pour les régions méditerranéennes. Elle est rependue en Europe méridionale, en Afrique du Nord et en Asie occidentale (**Ronat, 2001**).

En Algérie, *Mélissa* est cultivée dans les régions de la Kabylie. Néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du tell, où elle est signalée comme assez rare jusqu'en 1962. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen, les endroits frais et les forêts (**Feknous et al, 2013**).

I.3.6. Propriété thérapeutique de la plante

Les extraits de *Mélissa* sont des éléments thérapeutiques auxquels on attribue des effets Myorelaxant, Antispasmodique, Antioxydant, Antiviral et Anti-inflammatoire (**Babulka, 2005**). En France, elle est utilisée en médecine populaire contre les troubles digestifs (douleurs gastriques, digestion difficile, nausées dues à la grossesse...), contre les troubles nerveux (insomnie, nervosité, vertiges...), contre les douleurs (dentaires, auriculaires,

abdominales...) et en fin contre des trouble divers (faiblesse du cœur, bourdonnement d'oreilles, asthme...) (**Ronat, 2001**).

I.3.7. Utilisation traditionnelle de la plante

La feuille de *Mélissa* est utilisée le plus souvent sous forme d'infusion ou préférentiellement de gélules de poudre totale cryobroyée est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique des états neurotoniques des adultes et des enfants notamment en cas de troubles mineurs du sommeil et comme traitement symptomatique de troubles digestifs tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulence (**Rombi, 2015**).

Chapitre II : Métabolites secondaires

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis le XVIII^e siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent (**Iserin, 2001**).

II.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Leurs structures chimiques sont complexes, très dispersées et différentes selon les espèces. Ils sont produits en très faibles quantités. Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leurs apparences chimiques (**Fouche et al, 2000**).

II.2. Classification

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003**).

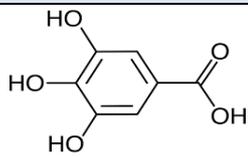
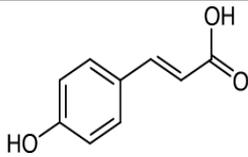
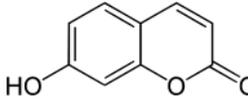
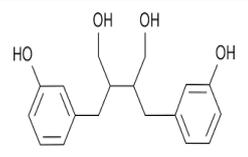
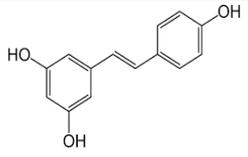
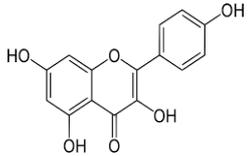
II.2.1. Composés phénoliques

Les polyphénols ou les composés phénoliques, sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, ils englobent plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques (**Bruneton, 1999**). Ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle formant un groupe phénol (anneau aromatique avec un groupe hydroxyle (**Stalikas, 2007**)).

On distingue les phénols simples, parmi eux les acides phénoliques, les flavonoïdes et les phénols complexes comme les tanins, les lignanes... (**Boros et al, 2010**).

Le tableau suivant résume les différentes classes des polyphénols :

Tableau 2 : Exemples de classes des polyphénols (Belyagoubi, 2011).

Classification des polyphénols	Squelettes	Exemples	Structure	Origine
Acide phénolique	C ₆ - C ₁	Acide gallique		Feuilles de thé
Acides hydroxy-cinnamiques	C ₆ - C ₃	Acide <i>p</i> -coumarique		Tomates, ail
Coumarines	C ₆ -C ₃	Omblliférone		Carottes
Lignanes	(C ₆ - C ₃) ₂	Entérodiol		Lin
Stilbènes	C ₆ - C ₂ - C ₆	Resveratrol		Raisin
Flavonoïdes	C ₆ - C ₃ -C ₆	kaempférol		Fraises

II.2.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants, on les retrouve dans toutes les plantes vasculaires, dans divers organes : racines, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes sont constitués de deux noyaux aromatiques (cycles A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (cycle C), c'est le squelette de la base des flavonoïdes (**Figure 03**).

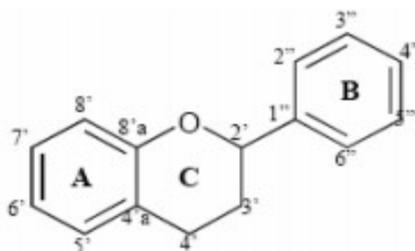


Figure 03 : Squelette de la base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

II.2.1.1.1. Rôles des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés pharmaceutiques des flavonoïdes sont largement étudiées. L'activité la plus remarquable c'est qu'ils sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants, effets antiallergiques, antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anticancéreuses (Meddleton et Kardasnam, 1993).

Les flavonoïdes préviennent le diabète en inhibant l'aldose réductase (Tringali, 2001) et possèdent aussi des propriétés préventives sur les neurones (Chen et al, 2008).

II.2.1.2. Anthocyanes

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993). Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs : insectes, oiseaux... (Figure 04).

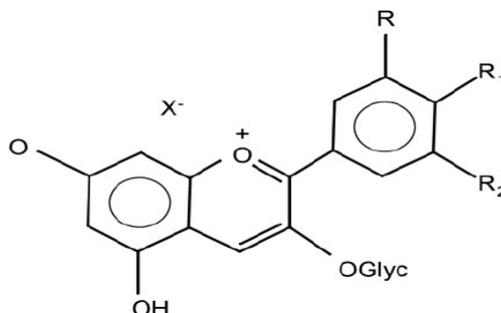


Figure 04 : Structure des anthocyanes (Belyagoubi, 2011)

II.2.1.3. Acides phénoliques

Les acides phénoliques se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Ils sont des composés poly-phénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux classes principaux, qui sont des dérivés d'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. Ils ont des effets antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire et chélateurs (Bruneton, 1999).

II.2.1.4. Tanins

Les tanins sont des substances constituées par un mélange de glucosides et d'acide gallique. On les rencontre en petite quantité dans de très nombreuses plantes (Verdrager, 1978). Ce sont des substances phénoliques assez complexes, dotées de propriétés tannantes, ce qui signifie qu'elles confèrent aux peaux (par réaction avec les protéines qu'elles contiennent) des propriétés d'imputrescibilité. Elles sont également astringentes, cytostatiques et bactéricides car elles interfèrent également avec les protéines du protoplasme, c'est pourquoi on utilise des préparations à usage local contenant des tanins, dans des cas de blessures, d'inflammation des muqueuses, d'hémorroïdes, de gelures et de brûlures (Ticli, 1997).

Aujourd'hui, on distingue :

- Les tanins hydrolysables, esters d'un sucre, qui est très généralement le glucose, et de l'acide gallique ou de l'acide ellagique (Figure 05).

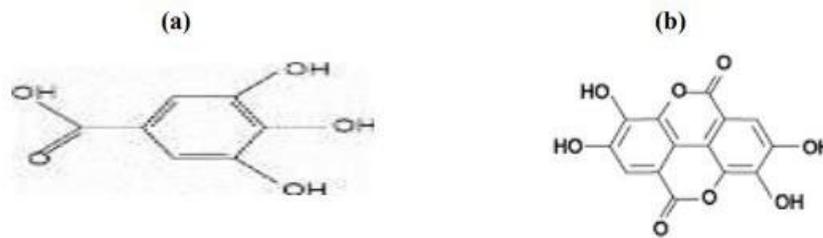


Figure 05 : Structure de l'acide gallique (a) et structure de l'acide ellagique (b)

- Les tanins condensés ou proanthocyanidols, (Figure 06) non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols. Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudocolloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois de cœur. La disparition des tanins, lorsque les fruits ont atteint leur maturation, montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante (Djefel ; 2017).

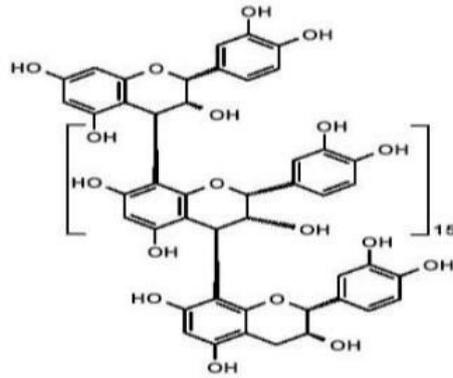


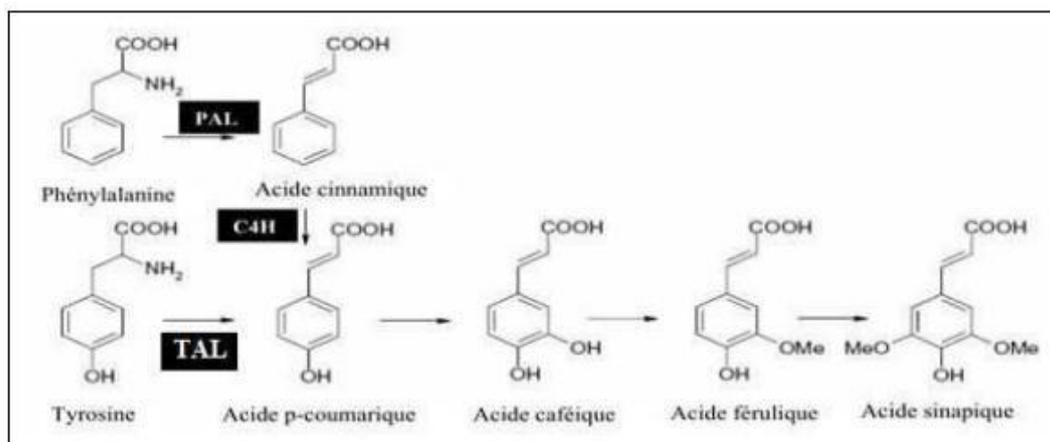
Figure 06 : Structure des tanins condensés

II.2.1.5. Coumarines

Les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

II.2.1.6. Biosynthèse des polyphénols

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique qui conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Figure 07) (Bruneton, 1993).



PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; TAL : tyrosine ammonia-lyse.

Figure 07 : Biosynthèse des composés phénoliques par voie Shikimate (Crozier *et al*, 2006).

II.2.1.7. Effets biologiques des polyphénols

Chez l'homme, les composés phénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils ont été décrits comme neuro-protecteurs, antiviral, anti agrégats plaquettaires, anti-inflammatoires, anti-allergènes, anti-thrombotiques, antioxydants et anti-tumoraux (Crozier *et al*, 2010). Selon Khelfallah(2013), la consommation d'aliments riches en polyphénols réduit l'incidence de nombreuses pathologies, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme additif colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999 ; Hanhineva, 2010).

II.2.2. Alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W.Meissner au début de 19ème siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Ce terme est dérivé de l'arabe « al kaly » qui signifie la soude et de grec « eidos » qui signifie l'aspect (Bruneton ,1999).

Ce sont des substances azotées possédant des réactions basiques et formant des sels avec les acides. Ils ont généralement une saveur amère.

La plupart des alcaloïdes possèdent une action physiologiques intense et les plantes qui les contiennent font partie des poisons végétaux les plus actifs, mais d'autres sont peu virulents ou sont présents en quantités tellement faibles que les plantes qui les contiennent ne sont pas toxiques (Guignard, 1979 ; Couplan, 2011).

II.2.2.1. Classification

- Les alcaloïdes vrais : l'azote inclus dans un hétérocycle, ils possèdent une activité pharmacologique (Bruneton, 1999).
- Les proto-alcaloïdes : ils ne possèdent pas un azote intra cyclique, ils ont une structure proche des amines (Guignard, 2000).
- Les pseudo-alcaloïdes : ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Bruneton, 1999).

II.2.2.2. Activités biologiques des alcaloïdes

- Les plantes utilisent les alcaloïdes dans leur système de défense contre les herbivores et les prédateurs à cause de leur amertume et toxicité (Guignard et al, 2002, Merghem, 2009).
- Chez l'homme, les alcaloïdes ont un rôle important dans la stimulation du rythme cardiaque, il est également utilisé pour provoquer la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement.
- Ils sont utilisés dans le traitement de l'asthme bronchique et comme médicament analgésiques et antiallergique .Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et anti microbienne (Mauro, 2006).

II.2.3. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte, largement répandus dans le règne végétal, (Bhat et al, 2005). Leur particularité structurale est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈) dérivées du 2 méthyl butadiène (Figure 08) (Bakkali et al, 2008). L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huile extraite de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Maleckey, 2005).

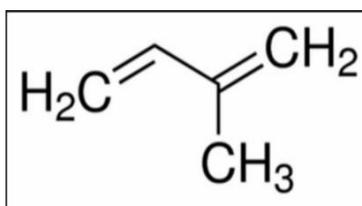


Figure 08 : Structure d'isoterpénoïde (Antoine, 2008)

Chapitre III : Activités biologiques

III.1. Activité anti-oxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connues sont la β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le pinnogénol. La plupart des antioxydants d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie à la capacité de ces composées naturelles à piéger les radicaux libre tels que les radicaux hydroxyles (OH.) et super-oxydes (O₂) (**Bartosz, 2003**).

1-Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule contenant un électron non apparié, extrêmement instable, donc très réactifs et par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de 10⁻⁴ secondes. Ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour apparier son électron (**Beckman et ammes, 1998**).

2-Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination (**zerargui, 2015**).

3-Antioxydants

Un antioxydant est définie comme une substance qui est ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, il est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation (**Park et al, 2001**).

3.1. Types d'antioxydants

3.1.1- Antioxydants enzymatiques

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants (supéroxyde dismutase, catalase), élaborés par notre organisme à l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al, 2004**).

3.1.2- Antioxydants non enzymatiques

Les protéines non enzymatiques telles que l'albumine, l'haptoglobine et la transferrine jouent un rôle antioxydant par chélation des ions (**Cutay et robin, 2000**).

3.1.3. Antioxydants nutritionnels

Les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), et l'acide ascorbique (vit C), les polyphénols et flavonoïdes sont les antioxydants essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydatif (Evans *et al*, 1996).

III.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : chaleur, rougeur ; douleur ; gonflement. (Kumar *et al*, 2003 ; Majno, 2004). L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé tandis que les tissus dépourvus de vaisseaux sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète (Ruslan, 2008).

III.2.1. Classification des agents anti-inflammatoires

III.2.1.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Ils sont des médicaments aux propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Plusieurs classifications sont proposées, fondées soit sur la structure des AINS, la puissance, les modalités d'action et /ou la sélectivité anti cyclo-oxygénase (cox)(Cuvillon *et al*, 2002).

Les AINS agissent tous en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (cox-1 et cox-2), diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines E et du thromboxane A₂ (Risser *et al*, 2009).

➤ Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose et la douleur (douleur dentaire, douleur post-opératoire). Le mécanisme d'action des AINS est l'inhibition de la cyclooxygénase (cox), enzyme clé de la biosynthèse de la prostaglandine. Cette enzyme a été conclue à l'existence de deux isoformes cox-1 et cox-2. La cox-1 est constitutivement exprimée dans les cellules normales (les plaquettes, reins...) alors que la cox-2 est spécifiquement exprimée dans les cellules inflammatoires et implique des réponses inflammatoires aiguës et chroniques. On pense que les AINS traditionnels inhibent à la fois la COX-1 et COX-2 et l'inhibition de la COX-1 provoque des effets indésirables (Hameed *et al*, 2007).

III.2.1.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Ils constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (**Barnes, 1998**) ; principal glucocorticoïde surrénalien .Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol (**Han et al, 2007**) dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse.

➤ Mode d'action des anti-inflammatoire stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens agissent en inhibant la réaction inflammatoire par l'inactivation de la phospholipase membranaire, ils empêchent la libération de l'acide arachidonique précurseur des prostaglandines et ils induisent la formation d'une protéine appelée lipocortine qui se fixe sur la phospholipase et la rend inactive.

III.2.1.3. Anti-inflammatoire d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cycloxygénase et la lipoxygénase (**Han et al, 2007**).

III.3. Activité sédatrice

Les médicaments thérapeutiques employés pour un effet sédatrice sont représentés par les tranquillisants mineurs, il s'agit de médications symptomatiques prescrites contre les états d'anxiété, de malaise, de tension émotionnelle ou d'insomnie (**Simon, 1979**).

Melissa officinalis et *Passiflora-incarnata* sont deux plantes connues et indiquées pour leurs effets sédatifs, et l'industrie pharmaceutique les emploie déjà depuis plusieurs années de ces mêmes indications. Cependant les différents travaux scientifiques, en particulier pour *Melissa officinalis*, ont été très succincts pour apporter une preuve confirmant ces indications (**Soulimani et al, 1991**).

L'acide gamma amino butyrique (GABA) exerce une diminution de l'activité neuronale, c'est le principal neuromédiateur inhibiteur cérébral présent dans tout le cerveau, il joue un rôle important chez l'adulte en empêchant l'excitation prolongée des neurones par fixation sur son récepteur post synaptique qui se traduit par un renforcement du potentiel électrique négatif de l'intérieur des neurones et donc une inhibition.

Des expérimentations animales ont montré que le blocage ou la diminution de son action inhibitrice normale par GABA T provoque un état d'anxiété, une hyperexcitabilité, des convulsions et peut même entraîner la mort (**Tessier, 1994**).

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie appliquée, Université de M'Hamed Bougera Boumerdes et au niveau du Centre de Recherche et de Développement (CRD) de SAIDAL, Alger. L'objectif de ce travail est de faire le screening phytochimique d'une plante médicinale et d'évaluer ses activités biologiques (antioxydante, anti-inflammatoire et sédative).

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique

La réalisation de cette étude a nécessité un ensemble d'appareils, de réactifs, de produits chimiques et de verreries (**Annexe 01**).

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Matériel végétal

La plante choisie comme modèle d'étude est *Mélissa officinalis* dont l'identification a été faite au niveau de l'Ecole National des Sciences Agronomiques (ENSA) Alger.

I.2.2. Matériel animal

Nous avons travaillé sur des souris mâles et femelles pesant en moyenne ($24g \pm 2$) obtenus de l'animalerie de CRD de SAIDAL ; Alger.

I.3. Préparation de la poudre végétale

- **Récolte**

La récolte de la plante a été effectuée durant le mois de février de l'année 2019 dans la région d'Ain el hammam, Tizi Ouzou.

- **Séchage**

Le séchage a pour but d'abaisser la teneur en eau, la plante récoltée est séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 20 jours.

- **Broyage et conservation**

Après séchage, la plante est broyée dans un broyeur électrique et la poudre ainsi obtenue est conservé à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons en verres (**Figure 09**).



Figure 09: La poudre de la plante *Mélissa officinalis*

II. Méthodes

L'ensemble des méthodes et des étapes de notre étude expérimentale sont résumés dans le diagramme ci-dessous (**Figure 10**).

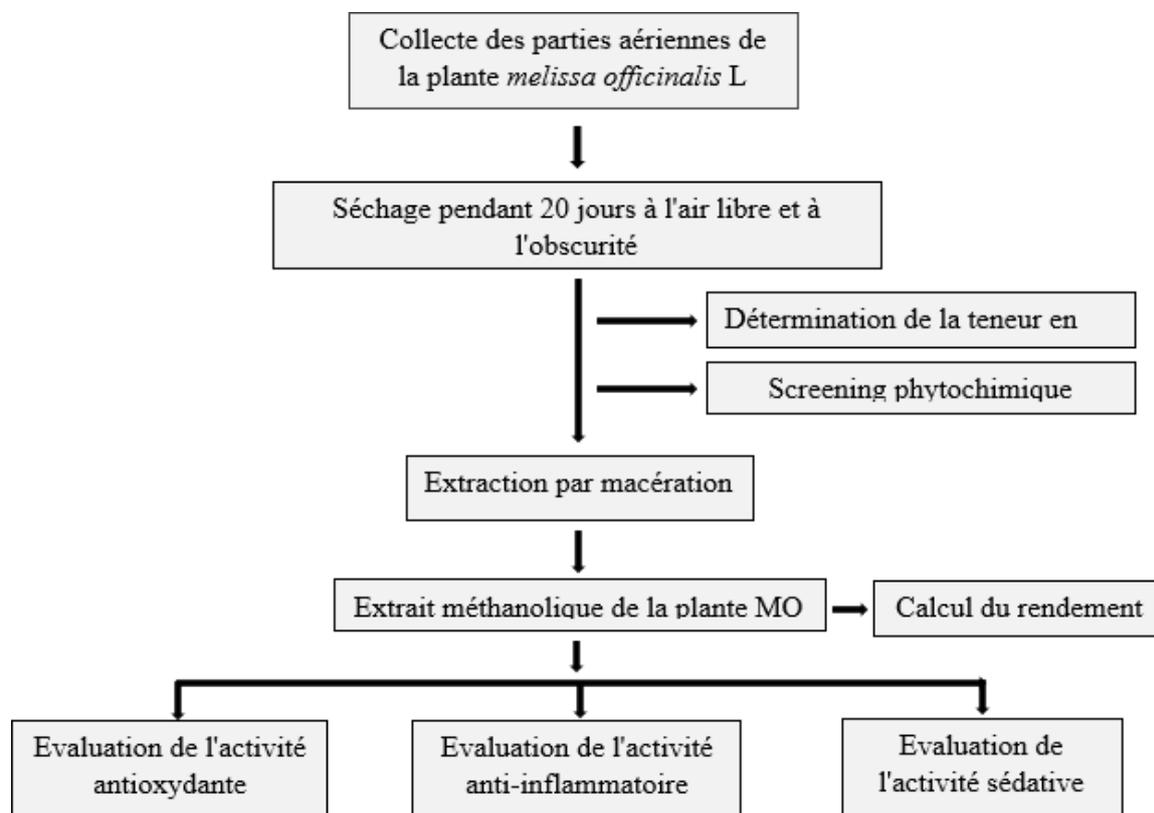


Figure 10:Diagramme représentant les différentes étapes de l'étude expérimentale sur la *M. officinalis*

II.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est définie comme étant la perte du poids lors de la dessiccation (**Audigié et al, 1978**). Elle est déterminée par le calcul de la différence du poids de la plante avant et après dessiccation selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

H : Teneur en eau.

P_f : Poids de la plante fraîche (g).

P_s : Poids de la plante sèche (g).

II.2. Screening phytochimique

Ce test permet une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et / ou de précipitation en utilisant des réactifs spécifiques, en vue de mettre en évidence des substances chimiques contenues dans la partie aérienne de *Mélissa officinalis*.

Ce screening a été réalisé sur la poudre de *Mélissa*, son infusé, son décoctât et sur son extrait éthanolique (Figure 11). Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites par Bruneton (1999).

➤ Préparation de l'infusé

Une quantité de 10g de la poudre végétale est ajoutée dans 100 ml de l'eau bouillante et la solution ainsi obtenue est gardée au repos pendant 30 min. Après filtration, nous avons obtenu l'infusé qui est à 10%.

➤ Préparation du décoctât

10g de la poudre végétale est mise en contact avec 100 ml de l'eau distillée puis portée à ébullition pendant 5 à 15 min. Après refroidissement, le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre de type Wattman.

➤ Préparation de l'extrait éthanolique

20g de la poudre est mise à macération pendant 24h avec 200 ml d'éthanol. Le macérât ainsi obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre de type Wattman et le filtrat est récupéré et conservé dans un flacon stérile jusqu'à son utilisation.



Figure 11 : Préparation de l'infusé, décoctât et de l'extrait éthanolique de la *M. officinalis*

II.2.1. Recherche des flavonoïdes

➤ Les flavonoïdes libres

2 milligrammes de Mg et 3 gouttes de HCl concentré sont ajoutés à 1 ml de l'infusé (10%). L'obtention d'une coloration rouge orangé indique la présence des flavonoïdes.

➤ **Les anthocyanes**

10 gouttes d'ammoniaque sont ajoutés à 5 ml de l'infusé (10 %). La réaction donne une coloration bleu verdâtre en présence des anthocyanes.

➤ **Les leuco-anthocyanes**

2 g de la poudre végétale sont introduits dans 20 ml d'un mélange de propanol / acide chlorhydrique (v/v), la préparation est placée dans un bain marie à 100°C pendant 2 à 3 minutes. Le développement d'une coloration rouge indique la présence des leuco-anthocyanes.

II.2.2. Recherche des tanins

➤ **Les tanins totaux**

3 gouttes de la solution FeCl_3 à 50% ont été ajoutés à 5 ml de l'infusé (10 %). L'apparition d'une coloration bleu noire ou verdâtre révèle la présence des tanins.

➤ **Les tanins catéchiques**

15 ml du réactif de Stiasny (**Annexe 02**) ont été ajoutés à 15 ml de l'infusé (10%), le mélange a été maintenu au bain-marie à 90°C pendant 15 min. L'observation d'un précipité rouge caractérise la présence des tanins catéchiques.

➤ **Les tanins galliques**

A l'aide d'une pipette graduée, 5 ml de l'infusé (10%) ont été introduits dans une fiole puis 2 g d'acétate de sodium sont ajoutés. L'addition de 3 gouttes de FeCl_3 à 1 % provoque après agitation l'apparition d'une coloration bleu foncée dénotant la présence des tanins galliques.

II.2.3. Recherche des quinones libres

Dans un bécher, 2 g de la poudre sont humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique 1 N, puis 20 ml de chloroforme sont ajoutés. Après 3 heures de repos, le mélange est filtré puis agité avec 5 ml d'ammoniaque à 50%. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

II.2.4. Recherche des sucres réducteurs

Vingt gouttes de réactif de Fehling (**Annexe 02**) ont été ajoutés à 1 ml de l'infusé à 10 % et 2 ml de l'eau distillée. L'observation d'un précipité rouge brique caractérise la présence des composés réducteurs.

II.2.5. Recherche des oses et holosides

Un ml du décoctât a été mélangé avec 5 ml d'éthanol. Cette réaction donne un aspect floconneux en présence des mucilages.

II.2.6. Recherche des stérols et triterpènes

5 ml de l'infusé (10 %) ont été ajoutés à 0,5 ml d'anhydride d'acétate, ensuite 1 ml d' H_2SO_4 a été ajouté au fond du tube sans agitation. La formation d'un anneau d'une coloration rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stéroïdes et triterpènes.

II.2.7. Recherche des alcaloïdes

2 ml de HCl ont été ajoutés à 5 ml de l'infusé (10%) plus 1 ml de réactif de Dragendorff (**Annexe 02**). L'observation d'un précipité rouge ou orange indique la présence des alcaloïdes.

II.2.8. Recherche des coumarines

5 ml de l'infusé (10%) ont été ajoutés à 0,5 ml de l'ammoniaque à 25 %. L'apparition d'une fluorescence sous une lampe UV à 365 nm caractérise la présence des coumarines.

II.2.9. Recherche des saponines

Un peu de l'eau distillée a été ajoutée à l'infusé (10%), ce mélange est soumis à une forte agitation et laissé au repos pendant 15 min. L'apparition d'une mousse plus au moins importante indique la présence des saponines.

II.2.10. Recherche des glycosides cardiaques

0,5 ml d'extrait éthanolique est agité avec 5 ml d'eau distillée. Ensuite, 2 ml de l'acide acétique contenant quelques gouttes de chlorure ferrique et 1 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés. La formation d'un anneau brun à l'interface indique la présence du glycoside cardiaque.

II.2.11. Recherche des hétérosides

➤ **O-Hétérosides**

5 ml de l'eau distillée et 0,5 ml de HCl ont été ajoutés à deux grammes de la poudre végétale épuisé précédemment par le chloroforme. Le mélange est chauffé ensuite pendant 15 min. Après refroidissement et filtration, 2,5 ml de chloroforme ont été ajoutés puis la phase organique formée a été soutirée. L'observation d'une coloration marron après l'addition de 0,5 ml de l'ammoniaque dilué indique la présence des o-hétérosides.

➤ **C-Hétérosides**

10 ml de l'eau distillée et 1 ml de $FeCl_3$ à 10% ont été ajoutés à la phase organique obtenue précédemment avec les o-hétérosides, puis chauffés pendant 30 minutes au bain-marie. Après refroidissement sous courant d'eau froide, la phase organique est séparée par l'addition de 5 ml de NH_4OH dilué à 50%. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de C- hétéroside.

II.3. Extraction méthanolique par macération

20 g de la poudre végétale sont mise en macération avec 250 ml de méthanol pur pendant 24h. Après extraction, l'extrait ainsi obtenu est filtré puis séché par évaporation à l'étuve.



Figure 12 : Extraction par macération

Figure 13 : Extrait sec de la *M. officinalis*

II.4. Détermination du rendement d'extraction

C'est le rapport entre la masse de l'extrait obtenu après l'évaporation du solvant et la masse de la matière végétale sèche (Annexe 03). Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rd}(\%) = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{mvs}}} \times 100$$

Rd : Rendement(%)

M_{ext} : Masse de l'extrait sec (g).

M_{mvs} : Masse de la matière végétale sèche (g).

II.5. Evaluation des activités biologiques

II.5.1. Activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH)

- Principe

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de la *M. officinalis* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'une spectrophotométrie mesurable à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH.) à la couleur jaune (DPPH-H) (Figure 14). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic, 2007).

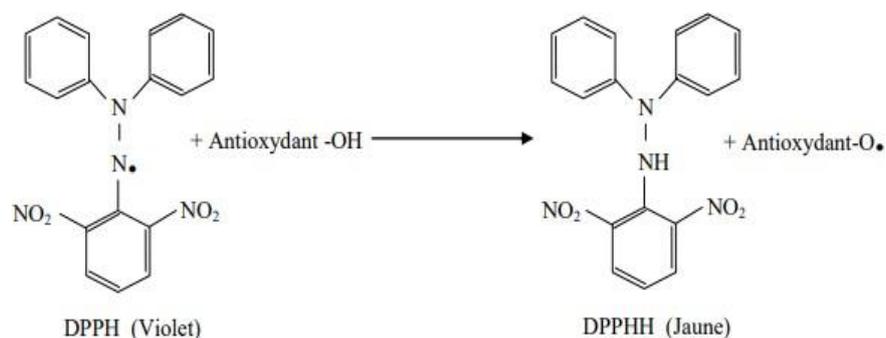


Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Talbi, 2015).

• Mode opératoire

Nous avons suivi le protocole décrit par **Sanchez-moreno et al (1998)**.

50ml de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutée à 1950 μ l de la solution méthanolique de DPPH déjà préparé (**Annexe 02**). Après agitation, le mélange réactionnel est incubé pendant 30min dans l'obscurité et à la température ambiante. L'absorbance du radical est mesurée à 517nm par un spectrophotomètre contre le blanc qui est constitué de 2 ml de méthanol.

Le control positif est présenté par un antioxydant standard (acide ascorbique) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'extrait à tester.

• Expression des résultats

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Abs du control} - \text{Abs d'échantillon}}{\text{Abs du control}} \times 100$$

- **Abs du control** : Absorbance du control (solution de DPPH sans l'extrait).
- **Abs d'échantillon** : Absorbance du DPPH en présence de l'extrait.

• Détermination d'IC₅₀

Selon **Samarth et al (2008)**, La valeur IC₅₀ est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration.

II.5.2. Activité anti-inflammatoire (Test de l'œdème de la patte)

• Principe

L'injection de la solution de carragénine (**Annexe 02**) sous l'aponévrose plantaire de la patte gauche de la souris déclenche une réaction inflammatoire qui est abaissée par l'administration d'un produit anti-inflammatoire.

Ce test permet d'évaluer l'activité en comparant la réduction de l'œdème de la patte après administration des doses équivalentes du produit à tester et de la référence utilisée (**Annexe 02**).

- **Mode opératoire**

Le protocole a été décrit par **Winter et al (1962)** et **Adeyemi et al (2002)**.

Nous avons constitué trois lots d'animaux de cinq souris chacun après un jeûne de 16 heures.

- **à T = 0**

Nous avons administré aux souris par voie orale les produits à testés (**Figure 15**). La distribution des lots et leurs traitements sont représentés dans le (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Répartition des lots avec leurs traitements (activité anti-inflammatoire)

	Lot témoin	Lot référence	Lot traité
Effectif	05	05	05
Traitement	0,5 ml d'eau distillée	0,5 ml d'Ibuprofène	0,5 ml de l'extrait méthanolique de <i>M.officinalis</i>



Figure 15 : Administration des traitements par voie orale

- **à T₀ + 30 min**

Nous avons injecté une suspension de 0,025 ml de carragénine dans la patte arrière gauche de la souris qui entraîne une augmentation significative du volume de l'œdème (**Figure 16**). La patte droite n'est pas traitée, elle est considérée comme un témoin.



Figure 16: Injection de la suspension de carragénine

Nous avons suivi l'évaluation de l'œdème par la mesure de l'épaisseur de la patte enflammée chaque une heure pendant quatre heures (**Annexe 04**) à l'aide d'un pied à coulisse digital (**Figure 17**).



Figure 17 : Mesure de l'épaisseur des pattes enflammées

Pour chaque lot traité, nous avons comparé l'épaisseur moyenne obtenue chaque une heure avec celle obtenue avant tout traitement.

- **Expression des résultats**

Calculer le pourcentage de l'œdème pour chaque une heure par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de l'œdème(\%)} = \frac{E_{TH} - E_{T0}}{E_{T0}} \times 100$$

E_{T0} : Epaisseur de l'œdème de la patte gauche à temps initial.

E_{TH} : Epaisseur de l'œdème de la patte gauche par heures.

Calculer le pourcentage d'inhibition d'œdème par les formules suivantes :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{\%O_T - \%O_E}{\%O_T} \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'inhibition(\%)} = \frac{\%O_T - \%O_R}{\%O_T} \times 100$$

$\%O_T$: Pourcentage de l'œdème du lot témoin.

$\%O_E$: Pourcentage de l'œdème du lot essai.

$\%O_R$: Pourcentage de l'œdème du lot de la référence.

II.5.3. Activité sédatrice

- **Principe**

Elle consiste à étudier la motilité spontanée par l'actimètre en armoire (**Annexe 05**) chez les souris. Cette étude permet de comparer la réduction de la motilité après administration de doses égales du produit sédatrice à tester et du produit de référence correspondant (**Annexe 02**).

- **Mode opératoire**

Le protocole a été décrit par le laboratoire de pharmacotoxicologie SAIDAL, Alger.

Nous avons constitué trois lots d'animaux de six souris chacun après un jeûne de 16 heures.

- **A T = 0**

Nous avons administré aux souris par voie orale les produits à testés. La distribution des lots et leurs traitements sont représentés dans le (**Tableau 04**).

Tableau 04 : Répartition des lots avec leurs traitements (activité sédatrice)

	Lot témoin	Lot référence	Lot essai
Effectif	06	06	06
Traitement	0,5 ml d'eau distillée	0,5 ml de Nevrosta	0,5 ml de l'extrait méthanolique de <i>M. officinalis</i>

- **A T₀ + 30 min**

Nous avons branché l'appareil de l'actimètre dont les douze sources lumineuses doivent s'allumer puis nous avons placé chaque souris dans une cage à plexiglas (**Figure 18**).

Le passage de la souris devant les faisceaux lumineux provoque l'enregistrement d'unité dans le totaliseur correspondant et les lectures se font après 30min.



Figure 18: Cage de plexiglas

- **Expression des résultats**

La moyenne de déplacement est calculée par la formule suivante :

$$m = \frac{\text{L'ensemble des déplacements}}{\text{Le nombre total de souris}}$$

Le pourcentage de réduction (PR) des déplacements chez les souris traités par rapport aux témoins est calculé par la formule suivante :

$$\text{PR (\%)} = \frac{\text{Nombre des déplacements (témoin)} - \text{Nombre des déplacements (essai)}}{\text{Nombre des déplacements (témoin)}} \times 100$$

PR : Pourcentage de réduction.

II.6. Etude statistique

II.6.1. Moyennes arithmétiques

$$m = \frac{\sum X_i}{n}$$

m : moyenne de chaque lot.

n : effectif du lot.

X_i : Valeurs individuelles de chaque paramètre

II.6.2. Variance et écart type

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - m)^2$$

L'écart type d'une variable x est défini comme suit :

$$S_x = \sqrt{S^2}$$

Chapitre II : Résultats et discussion

I.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau de notre extrait est de 70 %. Cette valeur est proche à celle trouvé par **Baker (1965), Yadav (2005) et Mahek (2011)**, qui ont travaillé sur la même espèce et ils ont enregistré un pourcentage d'humidité de 81,9 % pour la partie tige et 72,99 % pour la partie feuille.

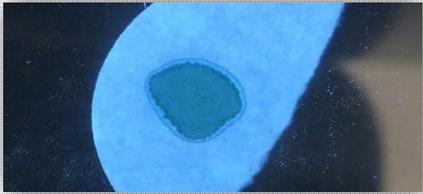
I.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques permettent de détecter les principaux composés chimiques présents dans la partie aérienne de *Mélissa officinalis*. Les résultats des tests réalisés sur l'extrait méthanolique, l'infusé et le décoctât de notre plante sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Résultats du screening phytochimique de la plante *M.officinalis*

Composés chimiques	Résultats positifs	Résultats obtenus
Flavonoïdes libres	Rouge orangé	 +++
Anthocyanes	Bleu verdâtre	 -
Leuco-anthocyanes	Rouge	 -
Tanins totaux	Bleu noire ou verdâtre	 +++

Tanins catéchiques	Précipité rouge	 -
Tanins galliques	Bleu foncé	 ++
Quinones libres	Rouge	 -
Composés réducteurs	Précipité rouge brique	 +++
Oses et holosides	Aspect floconneux	 +++
Stérols et triterpènes	Anneau rouge brunâtre	 +

Alcaloïdes	Précipité rouge ou orange	 +++
Coumarines	Fluorescence	 +
Saponines	Mousse	 +
Glycosides cardiaques	Anneau brun à l'interface	 +
O-hétérosides	Marron	 +++
C-hétérosides	Rouge moins intense	 ++

(-) : Absence, (+) : Présence en faible quantité, (++) : Présence en quantité moyenne, (+++) : Présence en quantité importante.

D'après le **tableau 05**, nous avons remarqué que les principaux composés présents en grande quantité dans la poudre de *mélisse* sont : les flavonoïdes, les tanins totaux, les composés réducteurs, les o-hétérosides, les oses et les holosides et les alcaloïdes. Les tanins galliques et les c-hétérosides sont moyennement présents tandis que les autres composés tels que les stérols et triterpènes, les coumarines, les saponines et les glycosides cardiaques sont présents en faible quantité. De plus, notre plante est caractérisée par l'absence totale des anthocyanes, des leuco-anthocyanes, des quinones libres. Nos résultats sont confirmés par **Mutalib (2015)** qui a enregistré la présence des tanins galliques, terpénoïdes et saponines, et l'absence des tanins catéchiqes. Par contre nos résultats sont peu différents à ceux obtenus par **Bounihi (2016)**, qui a travaillé sur la même plante, récoltée de la région d'El Djadida (Maroc). Cet auteur a mentionné d'une part la présence moyenne des flavonoïdes et des saponines, et d'autre part, l'absence totale des alcaloïdes et des stérols. Cette différence de composition, pourrait être liée à la variation des conditions climatiques, l'âge de la plante, la période de récolte et même aussi de la dessiccation.

Plusieurs auteurs ont révélé la richesse des plantes en flavonoïdes. **Ulubelen et al (2005)** ont signalé que chez les lamiacées, les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties de la plante et sont plus riches dans les parties aériennes. Ils représentent environ 0,2 à 0,7 % des constituants chez la *mélissa* (**Teuscher et al, 2005**). D'après **Cao et al (2015)**, les flavonoïdes ont de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques, y compris des antioxydants, des anti-inflammatoires, des antimicrobiens et des antis VIH.

I.3. Rendement d'extraction

Le rendement moyen de l'extrait méthanolique de la plante est de 7,79 % \pm 1,62. Plusieurs auteurs ont rapporté un rendement peu élevé. **Bounihi (2016)** a fait des études sur la même espèce provenant de Maroc et elle a signalé un rendement de 16,5 %. De plus en Algérie, **Adimi, (2018)** a récolté la même plante de la région de Sétif et il a signalé un pourcentage de 16.1% de l'extrait éthanolique de la mélisse. Cette variabilité du rendement pourraient être dues à plusieurs facteurs, tels que l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce végétal elle-même, le stade de la croissance, la période de récolte, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction (**Viljoen et al, 2006 ; Sefidkon et al, 2007**).

I.4. Activité antioxydante

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* sont représentés graphiquement dans les figures 19 et 20. (Annexe 06/07)

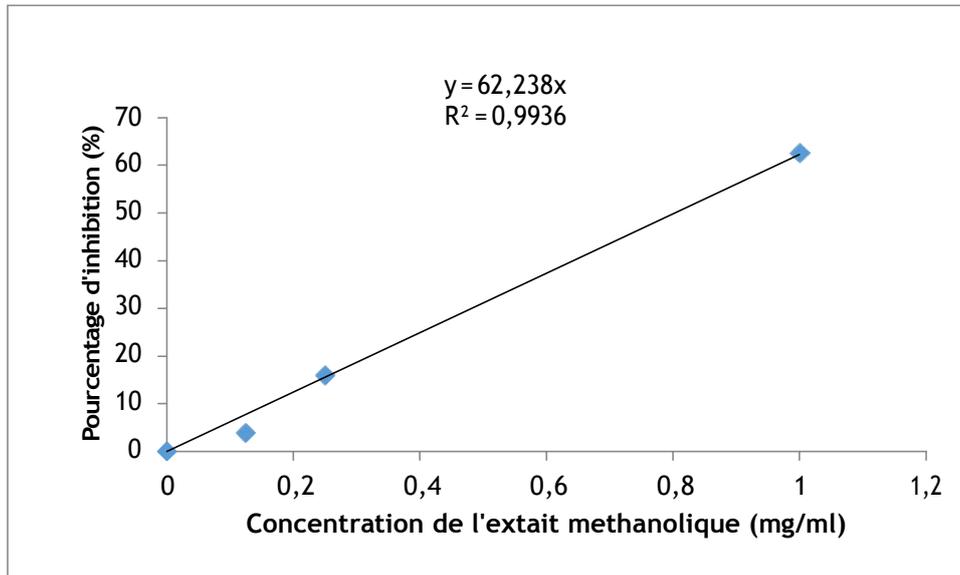


Figure 19 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différente concentration de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis*

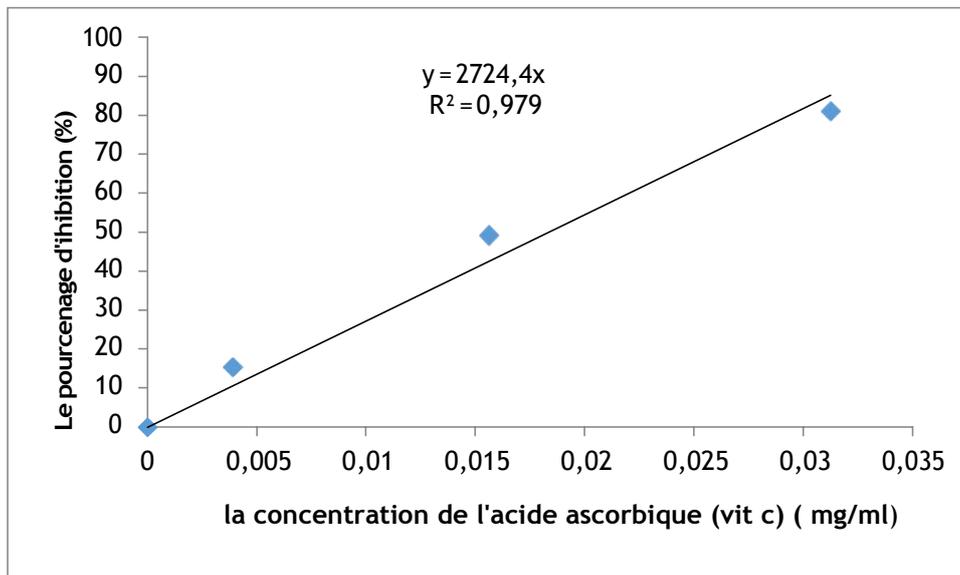


Figure 20 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différente concentration de l'acide ascorbique

Selon les figures 19 et 20, les résultats montrent que l'augmentation de la concentration de l'extrait provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité anti-radicalaire. Pour une concentration de 31,25 $\mu\text{g/ml}$, il apparait clairement qu'une faible activité de 7,38 % est obtenue par l'extrait méthanolique est qu'elle est devenue 62,62 % avec une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$, contrairement au standard

(AA) qui a exercé un fort effet antioxydant avec une valeur de 94,92 % pour une concentration de 1000 µg/ml. En comparant avec **Albayrak et al (2013)** qui ont travaillé sur la même plante provenant de la Turquie, ils ont testé l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique, de l'infusé et du décoctât, dont le résultat d'inhibition de ce dernier était de 92,32 % pour une concentration de 2 mg/ml. En outre, l'extrait méthanolique et l'infusé ont révélé un fort effet inhibiteur comparé à un autre agent antioxydant (BHT).

Détermination des IC50 de l'extrait et du standard

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %, plus la valeur d'IC50 est basse plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Nos résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 06 : Les valeurs d'IC50

	Extrait méthanolique de M.o (mg/ml)	Acide ascorbique (mg/ml)
IC 50	0,83	0,018

D'après le **tableau 06**, nous constatons que l'extrait méthanolique présente un effet antioxydant important vis-à-vis du radical DPPH. En effet la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH (IC50) est de 830 µg/ml pour l'extrait de *Mélissa officinalis* et de 18 µg/ml pour le standard (AA). La valeur de l'IC50 de l'extrait est supérieur à celle du standard néanmoins ce résultat reste satisfaisant. Ce résultat est différent de celui signalé par **Romaiana et al (2008)**, qui ont travaillé sur la même espèce ou ils ont trouvé une valeur d'IC50 de l'ordre de 483 µg/ml ±25,5. Par contre, il est en désaccord avec ceux d'**Albayrak et al (2013)** et **Sepide et al (2016)** qui ont testé le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de la même plante et ils ont enregistré des valeurs faibles d'IC50 correspondant à 20,16 µg/ml et 48,76 µg/ml respectivement.

Cette différence du pouvoir antioxydant est en fort corrélation avec la composition chimique de la plante (**Oke et al, 2009**). D'après **Peireira et al (2008)**, la mélisse pourrait être donc considérée comme un agent antioxydant dans la prévention de nombreuses maladies neurologiques liées à un stress oxydatif.

I.5. Activité anti-inflammatoire

La formation d'œdème dû à l'injection de la carragénine dans la pâte de souris est représentée par deux phases: la phase initiale qui se produit entre 0h et 2h30 après l'injection permet d'attribuer à la première heure la libération de l'histamine et la sérotonine, et la bradykinine à

la deuxième heure. Et la phase tardive qui est associée à la libération des prostaglandines qui peut survenir de 2h30 à 6h après l'injection.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* sont représentés dans les tableaux (07 et 08).

Tableau 07 : Pourcentage d'œdème de la patte postérieure gauche chez les souris traitées par Ibuprofène et l'extrait méthanolique de *M. officinalis*

Lot	Pourcentage de l'œdème (%)			
	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures
Témoin (Eau distillée)	25,53	34,22	45,57	44,68
Référence (Ibuprofène)	26,11	3,82	0	0
Essai (Extrait méthanoïque)	22,06	29,00	19,57	14,05

Tableau 08 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte postérieure gauche chez les souris traitées par ibuprofène et l'extrait méthanolique de *M. officinalis*

Lot	Pourcentage d'inhibition d'œdème (%)			
	1heure	2heures	3heures	4heures
Référence	35,55	87,01	98	98
Essai	13,59	15,24	57,06	68,55

D'après les résultats du tableau 07 et 08, l'injection sous plantaire de la carragénine aux lots témoin, référence et essai entraîne après une heure une augmentation significative du pourcentage d'œdème de 25,53%, 26,11 % et 22,06 % respectivement. Alors que le pourcentage d'œdème après 4 h était de 44,68% pour le témoin, de 14,05 % pour l'essai et la disparition d'œdème pour le lot de référence.

En effet, l'administration orale du médicament de référence (Ibuprofène 400 mg) et de l'essai (extrait méthanolique de *M. officinalis*), présentent une réduction du pourcentage d'œdème de la patte gauche de 98 % pour Ibuprofène, et de 68,55% pour l'extrait méthanolique de mélisse après 4 h par rapport au lot témoin. En comparant nos résultats avec ceux de **Bounihi (2016)**, l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *M. officinalis* faite sur des rats par l'utilisation de l'indométacine comme un produit de référence (10mg/kg), possède après 6h une inhibition importante allant de 55,88 % jusqu'au 70,58 %, en comparant au produit de

référence l'indométacine qui inhibe la formation de l'œdème avec 52,94%. Dans une autre étude, l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de M.O faite sur des rats avec induction de l'œdème par la carragénine et par l'utilisation de l'indométacine comme un produit de référence a montré que l'extrait aqueux à la dose de 100 mg/kg possède après 5 h une inhibition de 48,5 %, en comparant au produit de référence l'indométacine qui inhibe la formation de l'œdème avec 59,3% (Birdane, 2007).

I.6. Activité sédative

Le tableau ci-dessous représente les résultats de l'activité sédative in vivo de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis*. (Annexe 08)

Tableau 09 : Résultats de l'activité sédative

Lots	Témoin	Essai (Extrait méthanolique de M.o)	Référence (Nevrosta 1mg)
Nombre de déplacements	3263	1430	790
Moyenne de déplacements	543,83	238,33	131,67
Pourcentage de déplacement(%)		55,25	75,78

Après 30 min de la mise en place des trois lots (témoin, essai et référence) dans l'actimètre en armoire, nous avons enregistré les nombres de déplacement de 3263, 1430 et 790 respectivement.

Les lots de référence et de l'essai traités par le Nevrosta (1 mg) et l'extrait méthanolique de la plante étudié présentent un pourcentage de réduction de déplacement de 75,78% et de 55,25% respectivement.

D'après les résultats, nous avons déduit que le gavage par sonde gastrique de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* chez la souris induit une baisse de la motilité des animaux traités. En effet, notre extrait méthanolique exerce une bonne activité sédative observée à une dose de 2,5mg/kg. D'autres études comme celle menée par **Soulimani et al (1991)**, qui ont utilisé le test d'escalier pour évaluer l'activité sédative de l'extrait hydro-alcoolique de la mélisse, et ils ont signalé que l'extrait montre un effet sédatif chez la souris à une dose de 3mg/kg en observant une diminution de nombre de marche montée et de redressement dans le

test. Cette réduction pourrait être expliquée par l'inhibition du GABA T par l'extrait (**Awad et al, 2009**).

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connues par leurs propriétés thérapeutiques.

Ce travail avait pour objectif d'évaluer le screening phytochimique, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire et sédatrice des extraits méthanolique de la partie aérienne de *Melissa officinalis*

Les résultats de screening phytochimique ont montré que la plante est riche en flavonoïdes, alcaloïdes et tanins totaux, et les composées réducteurs alors qu'elle est caractérisée par une absence totale des anthocyanes, leuco anthocyanes et des quinones libres.

Les tests évaluant l'activité antioxydante ont montré que les extraits de la mélisse présente une valeur d'IC50 de l'ordre de 830 µg/ml donnant ainsi un bon pouvoir antioxydant.

Les résultats obtenus ont clairement montré que l'extrait méthanolique de la plante étudié donne une bonne activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition d'œdème de 68,55% après une durée de quatre heures.

Concernant l'activité sédatrice il apparait clairement que l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* présente un bon effet avec un pourcentage de réduction de la motilité correspondant à 56.17%.

En effet, les propriétés pharmacologique de *Melissa officinalis* révélées dans ce travail justifient leur application dans la phytothérapie traditionnelle et pourrait indiquer leur usage thérapeutique comme antioxydant, anti-inflammatoire et sédatrice.

En perspectives :

Nos résultats sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- Une caractérisation des composés phénoliques par HPLC.
- Etude d'autres propriétés biologiques telles que l'activité anti-diabétique, l'activité anti-microbienne ... ect.
- Tester d'autres molécules bioactives telles que les alcaloïdes, les saponines et les huiles essentiels...

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adeymi O.O., Okpo S.O and Oguni O.O, 2002.** Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana mill* (lawraccas). *Fitoterapia* ; 73: 375-380.
- Akharaiyi F.C and Boboye B, 2010.** Antibacterial and Phytochemical Evaluation of Three Medicinal Plants. *Journal of Natural Products* ; 3: 27-34.
- Albayrak S., Aksoy A., Albayrak S., and Sagdic O, 2013.** In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian journal of science and technology* ; 4 : 1-9.
- Antoine G, 2008.** Support de cours sur le métabolisme secondaire. Equipe pédagogique Physiologie Végétale ;(UMR 118 APBV). Université de Rennes.
- Audigié C., Dupont G et Zonszain F, 1992.** Principes des méthodes d'analyse biochimique. Vol 2, Ed Doin, Paris, 190p.
- Awad R., Muhammad A., Durst T., et al, 2009.** Bioassay-guided fractionation of lemon balm (M.O L) using an in vitro measure of GABA transaminase activity, *Phytotherapy*; 23:1075-1081.
- Babulk P, 2005.** La mélisse (*Melissa officinalis L.*). *Phytothérapie* ; 3: 114-117.
- Backer H.G, 1965.** Plant and civilization (belmont-california, Wadsworth publishing company), 145-157.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D and Idaomar M, 2008.** Biological effects of essential oils, *Food and chemical toxicology*; 46: 446-475.
- Barnes peter J, 1998.** Antiinflammatory actions of glucocorticoides molecular mechanisms. *Clinical science*; 94: 557-572.
- Bartosz G, 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems comments on toxicology; 9 (1): 5-21.
- Beckman K.B and Ames B.N, 1998.** The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* ; 78 (2) ; 547-581.
- Belyagoubi N, 2011.** Activité antioxydante des extraits des compose phénoliques de dix plantes médicinales de l'ouest et du sud- oust Algérien. Thèse de doctorat en Biologie, Université de Tlemcen, 109p.
- Bhat S.V., Nagasam pagi B.A and Sivakumar M, 2005.** Chemistry of natural products. Ed Narosa, New Delhi. India, 237p.
- Birdane O.Y., Buyukokuroglu M.E., Birdane F.M., Cemek M and Yavuz H, 2007.** Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis L.* In rodents; 158(2) :75-81.

- Boros B., Jakabova S., Dornye A., Horvath G., Pluhar Z., Kilar F and Felinger A, 2010.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography mass spectrometry in thymus species. *Journal of chromatography* ; 1217 : 7972-7980.
- 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
- Botineau M, 2010.** **Botanique** systématique et appliqué des plantes à fleurs, Ed, Tec et Doc .Lavoisier, Paris ; 1021-1043.
- Bruneton J, 2009.** *Pharmacognosie* : Phytochimie et plantes médicinales. 4^{ème} Edition, revue et augmentée, Paris, tec et doc. Edition médicales internationales ; 1288p.
- Bruneton J, 1993.** *Pharmacognosie* : Phytochimie plantes médicinales. 2^{ème} édition Lavoisier techniques and documentation, Paris.
- Bruneton J, 1999.** *Pharmacognosie* : phytochimie plantes médicinales. 3^{ème} Edition Tec & Doc, Paris : France; 1120p.
- Bruneton J, 1999.** *Pharmacognosie*, phytochimie, plantes médicinales. Edition tec et doc 3^{ème} édition, paris : France; 531-532.
- Cao H., Chen X., Jassbi A.R., et al, 2015.** Microbial biotransformation of bioactivrflavonoides. *Biotechnology*; 33 : 2014-223.
- Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L and Zhao J.W, 2008.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience letters*; 488(2) : 175-179.
- Couplan F, 2011.** **Guide** nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. Edition graficas estella. Espagne; 94p.
- Crozier A., Clifford M.N and Ashihara H, 2006.** Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the Human diet. Edition Black wellpublishing Ltd.
- Crozier A., Delrio D and Clifford M.N, 2010.** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular aspects of medicine*; 31: 446-467.
- Cuvillon P et Viel E, 2002.** Anti-inflammatoire non stéroïdiens anti cox-2 .une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aigue, *le courrier de l'algologie*; 1: 19-23.
- Cutay J et Robin M, 2000.** Intérêt des complexes antioxydantes. *J. Ethnopharmacol*, 203 (82) : 180-185.

- Dibong S.D., Mpondo M.E., Nigoye A., Kwin M.F et Betti J.L., 2011.** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* ; 37 : 2496-2507.
- Djeffell H.L., 2017.** Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes) du calice de *Carlinaacaulis* de la région de Tlemcen, Université de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie 8-9p.
- Dupont F et Guignard J.L, 2007.** Botanique : systématique moléculaire .Edition Masson 1ere édition, Paris ; 285p.
- Erlund I, 2004.** Review of the flavonoids quecetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivity, bioavailability, and epidemiology-nutrition research; 24, 851-874.
- Feknous S., Saidi F et Mohamed Said R, 2013.** Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de *la Mélisse officinalis*. Nature and Technology. Algérie.
- Fleurentin J and Balansard B, 2002.** The methodological approach used in this study is limited to field work. Conducting surveys among traditional healers to identify the use of depigmenting plants; 62 (1) : 8-23.
- Fonteau P, 2015.** Immunologie.De boeck.Paris.4eme ed, 310p.
- Fouche J.G., Marquet A et Hambuchers A, 2000.** Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes. Sart-Tilman.
- Girre L, 1985.** Nouveau guide des vieux remèdes naturels, Ouest France, Rennes.
- Goetz P., Ghedirak, 2012.***Mélissa officinalis* L. (Lamiaceae) : Mélisse. Phytothérapie anti infectieuse; 305-312p.
- Guigard J. L, 1979.** Abrégé de biochimie végétale. Edition masson, 2^{ème} édition. Paris, 215p.
- Guignard J.L, 2000.** Biochimie végétale. Edition Dumod, 2^{ème} édition, Paris ; 198-207p.
- Han T., Li H.L., Zhang Q .Y., Hanp ., Zheng H .C., Rahaman K and Qin L.P,2007.** Bioactivity guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *xanthium strumarium* L phytomedicine; 14,825-829.
- Hanhineva K., Torroneu R., Bondia-pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkanen H and Pontanen H, 2010.** Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol sci*; 11: 1365-1402.
- Hameed B.H., Ahmad A.A and Aziz N, 2007.** Isotherms, kinetics and thermodynamique of acid dye adsorption on activated palm ash; *Chemical Engineering*; 133:195-203.

- Igor pass L.B, 2002.** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo* des lamiacées .Thèse pharmacie pour obtenir le grade de Doctorat en pharmacie, Diplôme d'Etat.Bamako-Mali.
- Iserin P, 2001.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identifications, préparation, soins, 2nd édition. Dorling kindersiey limited, Londres.
- Khelfallah A, 2013.** Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Mémoire de magister : Biologie appliquée. Université de Constantine :134p.
- Krief S, 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse de doctorat. Muséum national d'histoire naturelle ; 32p.
- Kostowski W., Malatynska E., Plaznik A., Dyr w and Danysz W, 1986.** Comparative studies on antidepressant action of alprazolam in different animal models.*pol.j.pharmacology*; 38: 471-481.
- Mutaib L.Y, 2015.** Physicochemical, phytochemical and biological study of *Melissa officinalis* growing naturally in Kurdistan Region, Iraq: comparative study: 66-72.
- Majhenic L., Kerget M.S and Knez Z, 2007.** Antioxydant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Foods chemist* ;104 :1258-1268.
- Malecky M, 2005.** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse pour obtenir le grade de docteur de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, agro, Paris ; 9-27p.
- Mahek A., Tanveer N and Jayalakshmi S, 2001.** Pharmacognostical standardization and physicochemical valuation of leaves of *Verbascum thapsus* Linn; 3:334-340.
- Mauro neves muniz, 2006.** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs, la plus anatoxine-a et la plus au moins comptothécine. Thèse de doctorat : chimie. Université Joseph fourrier Grenoble 1 :181p.
- Meddleton E and Kardasnam J.C, 1993.** The flavonoids advances. In: research since 1986, London; 617-652p.
- Merghem R, 2009.** Elément de biochimie végétale. Edition bahaeddine; 149-158.
- Mika A., Minibayeva F., Beckett R and Luthje S, 2004.** Possible functions of extracellular peroxidase in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry reviews*; 3(1-2) : 173-193.

- Oke F., Aslim B., Ozturk S and Altundag S, 2009.** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Saturejacuneifolia* ten. *Food chemistry*; 112(4) : 874-879.
- Park P., Jung W., Nam K., Shahidi F and Kim S, 2001.** Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *J.the American oil chemists society*; 78(6) : 651-656.
- Pereira R.P., Fachinnetto R., Puntel R.L and al., 2008.** Antioxydant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Pharmacopée Européenne*, 6^{ème} édition.
- Quezel P et Santa S, 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridional ,Tome II. Ed C N.R.S, Paris.
- Rice-evans C., Milles N and Paganga G, 1997.** Antioxydant properties of phenolic compound .*trends plant SCI* ; 2:152-159.
- Riser A., Donovan D., Heintzman J and Pag T, 2009.** NSAID prescribing precautions. *American family physician*, 80(12) : 1371.
- Ronat N, 2001.** *La Mélisse (Melissa officinalis L.)*. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, Faculté de Pharmacie de Grenoble ; 12 (53) : 14-15.
- Romaiana P.P and Roselei F, 2008.** Antioxydant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*. *Matricaria recutita* and *Cymbopogon Citratus*.
- Rombi M, 2015.** *Le Dictionnaire Des plantes médicinales* ; 480-481p.
- Sanago R, 2006.** *Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle*. Université Bamako (Mali) ; 53p.
- Sanon A., Garba M., Anger J and Huiganrt J, 2002.** *Journal of Stored Products Research*; 38 : 129.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A and saura-calixto F,1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International*; 8: 121-137.
- Sefidkon,F, Abbasi K., Jamzad Z and Ahmadi S, 2007.** The effect of distillation methods and stage of plant growth in the essential oil content and composition of *Satureja Rechingeri* jamzad . *Food Chemistry*; 100 : 1054-1058.
- Simon P, 1979.** *Anxiolytiques in pharmacologie Clinique. Bases de la thérapeutique* ; 2 :1621-1631.

- Soulimani R., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R., Derrieu G and Peltj M, 1991.** Sedative and anxiolytic effects of aqueous and hydroalcoholic extract of *Mélissa officinalis* L in the mouse. *Planta medica*; 57, (2) :105-109.
- Soulimani R., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R., Derrieu G et Pelt J.M, 1991.** Activité neurotrophe de l'extrait hydroalcolique de *Mélissa officinalis* L. France ; 316-318.
- Soulimani R., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R., Derrieu G and Pelt J.M, 1991.** Neurotropic action of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* L. in mice *plantamedica*; 2p.
- Soulimani R., Younos C., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R et Derrieu G, 1993.** Recherche de l'activité biologique de *Melissa officinalis* L. sur le système nerveux central de souris in vivo et le duodénum de rat in vitro. *Plante médicinales et phytothérapie* ; 26 (2) : 77-85.
- Talbi H., Boumaza A., El-mostzfa K., Talbi J et Hilali A, 2015.** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigellasativa* L. Université Hassan 1^{er} (Maroc) ; 1115p.
- Teusher E., Anton R et Lobstein A, 2005.** Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec et doc ; 300-303p.
- Tessier A, 1994.** Phytothérapie analytique, Phytochimie et Pharmacologie. Edition Maroc-Aurèle; 175-184p.
- Ticli B, 1997.** L'herbier de santé. 1^{ère} édition Vecchisao; 01-206p.
- Tringali C, 2001.** Bioactive compounds from natural sources: Isolation characterisation and biological properties. 1^{ère} édition Taylor and, London; 693p.
- Ulbricht C., Brendler T., Gruenwald J and al, 2005.** Lemon balm (*Mélissa officinalis* L): an evidence based systematic review by the natural standard research collaboration. *J. Herb Pharmacother* ; 5 (4) : 71-114.
- Verdrager J, 1978.** Ces médicaments qui nous viennent des plantes. 1^{ère} édition, Paris, édition maloine, S-A; 01-233p.
- Vivas N and Monier M.F, 2002.** Setting up enological tannins and bases for a new qualitative definition. Université Bordeaux I; 853-854p.
- Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J and Edwards T.J, 2006.** Micro distillation and essential oil chemistry a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (lamiaceae), south African journal of botany; 72 : 99-104.

Winter C.A., Risley E.A and Nuss G.W, 1962. Carrageenan induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity *Drug*; 111: 544-7.

Yadav R.K., Karamanoli K and Vokou D, 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol*; 13.

Youla A et Latrous I.E, 2017. Contribution à l'étude Phytochimique des flavonoïdes chez l'espèce (*M. officinalis L*) et évaluation de leur pouvoir antibactérien. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master, Constantine.

Zerargui F, 2015. Activité antioxydante des extraits de racines *tamu communis L* et caractérisation des substances bioactives. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif.

Annexes

Annexe 01 : Matériels non biologiques

Réactifs	Verreries	Appareils et équipements
Acide chlorhydrique (HCl)	Fiole	Broyeur électrique
Propanol	bécher	Bain marie
Réactif de stiasny	Pipettes graduées	Lampe UV
Acétate de sodium	Entonnoirs	Spectrophotométrie
Chlorure de fer (FeCl à 1%;5% ; 10%)	Spatule	Actimètre
Chloroforme (CHCL ₃)	Tubes à essai	Balance analytique
Ammoniaque (NH ₄ OH à 25% ; 50%)	Pipette pasteur	Agitateur
Réactif de Fehling	Flacons en verre	Etuve
Ethanol	Eprouvettes	Plaque chauffante
Méthanol	Erlenmyer	Pied à coulisse digital
Anhydride d'acétate		
Acide sulfurique(H ₂ SO ₄)		
Réactif de dragendroff		
Acide acétique (CH ₃ COOH à 10%)		
Chlorure ferrique		
Carragénine		
DPPH		
Ibuprofène		
Nevrosta (1mg)		
Acide ascorbique (vitamine c)		

Annexe 02 : Préparation des réactifs et des solutions

➤ Réactif de stiasny

- Formaldéhyde a 40%.....10ml

- HCL concentré.....5ml

➤ Réactif de dragendroff : il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions A et B.

Solution A :

Nitrite de bismuth.....0,85g

Eau distillée40ml

Acide acétique.....10ml

Solution B :

Iode de potassium.....8g

Eau distillée.....2ml

- On mélange les deux solutions (A et B) ; ensuite on ajoute 20ml de l'acide acétique et on complète à 100ml avec de l'eau distillée

➤ **Réactif de Fehling** : il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions A et B

Solution A :

CuSO₄.....35g

Eau distillée.....500ml

H₂SO₄.....5ml

- Laisser refroidir et compléter à 1 litre de l'eau distillée.

Solution B :

Sel de seignette.....150g

Eau distillée.....500ml

- Laisser refroidir et ajouter 300ml de lessive de non carbonatée puis ajuster jusqu'au 1L avec de l'eau distillée.

DPPH

La solution de DPPH est préparé dans un bécher par dissociation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, le mélange est vigoureusement agité pendant 3 heures puis incubé à température de laboratoire et à l'obscurité.

Acide ascorbique

Il consiste à mélanger dans un bécher 10 mg de l'acide ascorbique avec 10 ml de l'eau distillée.

➤ **Solution mère de l'extrait méthanolique de *M. officinalis***

Dans un eppendorf, 22 microlitre de l'extrait méthanolique est dilué avec 2 ml d'eau distillée. A partir de chaque solution mère, une gamme de dilution est préparée (1mg/ml ; 0,5mg/ml ; 0,25mg/ml ; 0,125mg/ml ; 0,0625 mg/ml ; 0,3125 mg/ml) dans des tubes.

➤ **Solution de la carragénine**

Nous avons mélangé graduellement une quantité de 0,5 g de la carragénine avec 25 ml de l'eau distillée puis nous avons complété le volume jusqu'à 50 ml.

➤ **Solution du produit de référence Ibuprofène**

Nous avons utilisé Ibuprofène comprimé de 400 mg dont la dose maximal est de 20 mg/kg (**Vidal**). Sachant que le poids moyen des souris utilisées est de 25 g donc la dose administrer pour chaque souris est de 0,5 mg.

Chaque souris recevra un volume de 0,5 ml de médicament, ainsi on dissout un comprimé d'Ibuprofène de 400 mg dans 100 ml d'eau distillée puis on complète jusqu'à 400 ml.

➤ **Solution du produit de référence Nevrosta**

Pour la préparation de cette solution ,nous avons utilisé Nevrosta comprimé de 1 mg dont la dose active est de 2,5 mg/kg (**Vidal**,) sachant que le poids moyen des souris utilisé est de 20 g par conséquent la dose à administrer à chaque souris est de 0,05 mg et donc chaque souris recevra 0,5 ml de médicament. Alors nous dissolvons un comprimé de 1 mg dans 5 ml d'eau distillée puis nous ajustons le volume jusqu'au 10 ml.

Annexe 03 : le rendement

Extrait	Rendement (%)
Extrait1	5,88
Extrait2	7,66
Extrait3	9,85
Moyenne	7,79±1,62

Annexe 04: Les mesures de l'épaisseur de la patte enflammée de chaque souris, chaque 1heur pendant 4heurs

➤ **Pour le lot essai (extrait méthanolique de M.o)**

	T0	T1	T2	T3	T4
S1	1,15	1,23	1,46	1,36	1,31
S2	1,10	1,42	1,40	1,31	1,28
S3	1,07	1,43	1,45	1,36	1,24
S4	1,14	1,38	1,48	1,37	1,30
S5	1,16	1,40	1,46	1,32	1,28
Moyenne	1,12±0.03	1,37±0.07	1,45±0.02	1,34±0.02	1,28±0.02

➤ Pour le lot témoin

	T0	T1	T2	T3	T4
S1	1,11	1,48	1,57	1,79	1,65
S2	1,17	1,48	1,49	1,63	1,77
S3	1,12	1,41	1,58	1,63	1,75
S4	1,12	1,31	1,34	1,35	1,33
S5	1,12	1,4	1,59	1,81	1,66
Moyenne	1,12±0.02	1,41±0.06	1,51±0.09	1,64±0.16	1,63±0.15

➤ Pour le lot de référence (ibuprofène)

	T0	T1	T2	T3	T4
S1	1,61	1,83	1,26	1,24	1,17
S2	1,81	2,52	2,01	2	1,74
S3	1,09	1,75	1,61	1,51	1,43
S4	1,95	2,03	1,73	1,52	1,41
S5	1,43	1,8	1,58	1,44	1,32
Moyenne	1,57±0.30	1,986±0.28	1,63±0.24	1,54±0.25	1,41±0.18

Annexe 05:L'actimètre en armoire

Annexe 06 : Densité optique de la réduction du DPPH par l'extrait et l'acide ascorbique

	control	Extrait mère	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Extrait de M.O	0,650	0,243	0,388	0,546	0,625	0,601	0,602			
AA	0,532	0,061	0,064	0,16	0,23	0,33	0,42	0,51	0,45	0,449

Annexe 07: Pourcentage d'inhibition de l'extrait et de l'acide ascorbique

	Extrait mère	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Extrait de M.O (%)	62,62	40,31	16	3,84	7,54	7,38			
AA (%)	94,92	92,85	91,35	90,60	81,20	49,23	11,65	15,42	19,17

Annexe 08: Nombre de déplacements

	Témoin	Essai (Extrait de la M.o)	Référence (NEVROSTA1mg)
S1	715	530	126
S2	241	511	190
S3	835	3	114
S4	578	1	120
S5	601	7	115
S6	293	378	125
Moyenne	543,83±213,36	131,66±26,47	238,33±239,49

