

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

*Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou*  
*Département des sciences alimentaires*



## Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention de diplôme de master  
Spécialité : Agroalimentaire et contrôle de qualité



### THEME

**Effet des méthodes d'extractions sur les  
teneurs en composés phénoliques et l'activité  
antimicrobienne de « *Mélissa officinalis L* »**

Présenté Par :  
**AMOKRANE Louiza**  
**DJENNADI Mohamed Amine**

Présidente	Boudaoud Sonia	Maitre de conférences	UMMTO
Examinatrice	Boudraa Hayet	Maitre de conférences	UMMTO
Promotrice	Benmalle Remane Y	Maitre de conférences	UMMTO

**2024/2025**

# *Remerciements*

Avant de commencer la présentation de cette étude nous profitons l'occasion pour remercier du fond du cœur toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, nous remercions sincèrement Dieu le tout puissant pour nous avoir accordé la patience, le courage et la détermination nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Mme Benmalle Remane Yakout professeur encadrante pour son soutien et pour son aide et ainsi pour sa personnalité compréhensive et aimable, et qui nous a soutenu et orienté durant toute la période de la réalisation de ce travail.

Nous adressons aussi nos remerciements aux membres de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un merci spécial est également adressé au responsable du laboratoire d'université, et spécialement pour Mme Bouazzouni Khadidja pour sa responsabilité et sa présence et disponibilité inébranlable, et ainsi qu'à tous les membres du laboratoire.

# *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

Aux êtres les plus chère à mon cœur, mes parents qui ont toujours cru en moi et encouragée, pour toutes les peines et les sacrifices qu'ils se sont donnés pour me voir réussir dans la vie. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma chère mère et cher père

Pour votre amour inconditionnel, vos encouragements constants et vos sacrifices silencieux. Vous avez été mon pilier dans les moments de doute et ma plus grande source de motivation.

A mes deux grands sœurs Katia et Leila

Sans oublier tous mes camarades qui ont été présent dans laboratoire et spécialement ma binôme Louiza.

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

Aux êtres les plus chère à mon cœur, mes parents qui ont toujours cru en moi et encouragée, pour toutes les peines et les sacrifices qu'ils se sont donnés pour me voir réussir dans la vie. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et m'encourage et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma chère sœur Hanane et mon petit frère Rayane et sans oublier mon cher amour César

Sans oublier tous mes camarades qui ont été présent dans laboratoire et spécialement mon binôme Amine

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction .....	1
Partie 1 :Synthèse bibliographique	
Chapitre I :Généralité sur la mélisse officinale : <i>Mélissa officinalis</i> L.....	3
I.1.Description botanique de la plante : .....	3
I.2.Classification botanique .....	4
I.3.Les principaux constituants de <i>Mélissa officinalis</i> .....	4
I.4.Les principaux effets de la mélisse .....	5
Chapitre II : Métabolite secondaire de <i>Mélissa officinalis</i> .....	6
II.1.Les composés phénoliques de la mélisse : .....	6
II.1.1.Définition.....	6
II.1.2.Classification des composés phénoliques :.....	6
II.1.2.1.Flavonoïdes.....	6
II.1.2.2.Acides phénoliques.....	7
II.1.2.3.Les coumarines .....	7
II.1.2.4.Tanins .....	7
II.1.2.5.Anthocyanosides.....	7
II.1.2.6. Quinones .....	8
II.2.Utilisation de la mélisse : .....	8
II.2.1.Utilisation traditionnelle :.....	8
II.2.2.Utilisation industrielle dans le domaine agroalimentaire.....	9
Chapitre III : Les activités biologiques de la plante .....	10
III.1. Les activités biologiques.....	10

III.2.L'activité anti-oxydantes .....	10
III.3.Activité anti- microbienne.....	11
Partie 2 : Partie pratique.....	13
I. Objectif de l'étude .....	13
II.Matériel végétal.....	13
II.1.Matériel biologique.....	13
II.2.Matériel non biologique.....	13
II.3.Préparation des extraits de <i>Mélissa</i> .....	13
II.4.Méthodes d'extractions :.....	13
1. Extraction aqueuse.....	13
2. Macération hydro-éthanolique.....	14
3. Soxhlet.....	14
II.5. Calculs de rendement.....	15
II.6. Taux de cendre.....	15
II.7. Taux d'humidité.....	15
II.8. Dosage des polyphénols totaux.....	16
II.9. Dosage des flavonoïdes.....	17
III. Activité antimicrobienne .....	17
III.1. Réception des souches.....	17
III.1.1. Revivification des souches.....	18
III.1.2. Coloration de Gram .....	19
III.1.3. Test de catalase.....	19
III.1.4. Test d'oxydase .....	19
III.1.5. Test d'ADNase.....	19
III.2. Technique d'antibiogramme .....	20
III.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI).....	22
Partie 3 : Résultats et discussion.....	24
I. Résultats des analyses physico-chimiques.....	24
1. Teneur en cendre et en humidité de la poudre de <i>Mélissa officinalis</i> .....	24

2. Rendement en composés actifs des 3 types d'extraction.....	24
3. La teneur en polyphénols totaux.....	26
4. Teneur en flavonoïdes.....	28
II. Résultats des analyses microbiologique.....	29
1. Aspect morphologique des bactéries.....	29
2. Résultats de l'antibiogramme.....	30
3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la CMI.....	36
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des abréviations

**MS** : Matière sèche

**ANS** : Académie nationale des sciences

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**EAG** : Equivalent d'Acide Gallique

**EQ** : Equivalent Quercitine

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth.

**MRSA** : *Staphilococcus* résistant à la méthiciline

**MH** : Mueller Hinton

**PPT** : Polyphénols Totaux

**RDT** : Rendements Totaux

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EtOH** : Ethanol

**HE** : Hydroéthanolique

## Listes des figures

<b>Figure 01 :</b> <i>Melissa officinalis</i> L.....	03
<b>Figure 02 :</b> Activités biologiques de <i>M.officinalis</i> .....	10
<b>Figure 03 :</b> Etapes de l'extraction par infusion de la mélisse officinale.....	14
<b>Figure 04 :</b> Extraction de la poudre de <i>Mélissa officinalis</i> par soxhlet.....	15
<b>Figure 05 :</b> Photos des différentes souches utiliser.....	18
<b>Figure 06 :</b> Identification de <i>Staphylococcus aureus</i> : test DNase.....	20
<b>Figure 07 :</b> Techniques d'antibiogramme sur milieu gélosé des différents souches.....	21
<b>Figure 08 :</b> Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	23
<b>Figure 09 :</b> Teneur en polyphénols de la mélisse .....	26
<b>Figure 10 :</b> Teneur en flavonoïdes.....	28
<b>Figure 11 :</b> Souches bactériennes sous microscopes optique.....	30
<b>Figure 12 :</b> Résultats d'antibiogramme sur l'extrait aqueux.....	31
<b>Figure 13 :</b> Résultats d'antibiogramme sur l'extrait hydro-éthanolique.....	32
<b>Figure 14 :</b> Résultats d'antibiogramme sur l'extrait de soxhlet.....	34

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
I	Caractéristiques des souches microbiennes testées .....	22
II	Teneurs en cendre et en humidité de la poudre de <i>la mélisse officinale</i> ...	24
III	Rendement des 3 types d'extraction de <i>la mélisse</i> .....	25
IV	Résultats des observations microscopique des souches utiliser .....	29
V	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de <i>la mélisse</i> ..	30
VI	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de <i>la mélisse</i> .....	29
VII	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de soxhlet de <i>la mélisse</i> .....	33

# Introduction

## Introduction

Depuis toujours, l'homme a eu recours aux plantes pour se nourrir, se soigner mais aussi pour se parfumer sans connaître réellement les propriétés de ces plantes. A travers les siècles, il a pu, grâce à ses expériences et son intelligence, accumuler un savoir important des vertus médicinales des plantes (**Boullard, 2001**).

Les plantes médicinales constituent un réservoir de biomolécules d'intérêt thérapeutique, telles que les alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes et acides phénoliques. Ces composés naturels présentent diverses activités pharmacologiques (antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse) et inspirent la conception de nouveaux médicaments, notamment face à la résistance microbienne et aux maladies chroniques (**Dar et al, 2023**)

L'Algérie par son aire géographique et diversité climatique est riche en flore naturelle, la gamme des plantes aromatiques et médicinales fait partie du grand patrimoine végétal du pays. Ces plantes suscitent beaucoup d'intérêt, car en dehors de leur utilisation traditionnelle, elles constituent une ressource naturelle exploitable par l'industrie et contribuerait au développement socio-économique du pays.

La famille des Lamiaceae est largement représentée par les plantes aromatiques et médicinales appartenant à plusieurs genres (**Sprea, R.M et al, 2022**). Nous avons choisi comme support d'étude : *Melissa officinalis* L (la mélisse officinale). Cette espèce est employée par la médecine traditionnelle en raison de ses propriétés sédatives, carminatives, antispasmodique et antivirale. Son huile essentielle présenterait une activité anti parasitaire, anti-inflammatoire et antifongique. Selon **Shakeri et al, (2016)**, elle est notamment riche en composés phénoliques, en acide rosmarinique et en flavonoïdes, elle présente des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (usage traditionnel ancestral dans le traitement des troubles nerveux et digestif).

Pour son utilisation traditionnelle, la mélisse officinale est récoltée à l'état sauvage et commercialisée par les herboristes.

Malgré son intérêt pharmacologique, cosmétique et agroalimentaires, la mélisse n'est pas exploitée en Algérie comme une solution pour le progrès de la médecine moderne, et on s'est largement reposé sur l'utilisation d'agents antimicrobiens, en particulier les antibiotiques. L'usage excessif et inapproprié de ces derniers favorise l'apparition de résistances microbiennes, compromettant l'efficacité des traitements et posant un sérieux problème de

santé publique. Dans ce contexte, les plantes médicinales riches en composés bioactifs comme les composés phénoliques, apparaissent comme une alternative naturelle prometteuse grâce à leurs propriétés antimicrobiennes croissantes.

Dans le cadre du présent travail, nous nous sommes proposés d'étudier l'influence de différentes techniques d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et sur l'activité antimicrobienne de la mélisse officinale (*Melissa officinalis* L.). Cette plante, largement reconnue pour ses propriétés biologiques, constitue une source importante de métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes, dont les activités antioxydantes et antimicrobiennes sont bien établies. L'objectif principal de cette étude est de comparer l'efficacité de plusieurs méthodes d'extraction en vue de déterminer celle permettant d'optimiser l'extraction de ces composés bioactifs. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits obtenus visera à identifier les protocoles les plus appropriés pour de potentielles applications dans les domaines pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire. Les résultats attendus pourraient contribuer à la valorisation de cette plante en tant qu'alternative naturelle aux antimicrobiens de synthèse, dans un contexte où la lutte contre la résistance bactérienne constitue un enjeu majeur de santé publique. Afin de répondre à ces objectifs, ce travail est structuré en trois parties : une revue bibliographique consacrée aux caractéristiques botaniques, phytochimiques et biologiques de *Melissa officinalis*, ainsi qu'aux principales techniques d'extraction ; une partie expérimentale détaillant le matériel, les méthodes d'extraction, les dosages des composés phénoliques et flavonoïdes, ainsi que les tests d'activité antimicrobienne ; enfin, une section dédiée à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats, suivie d'une conclusion générale synthétisant les principaux apports de cette étude.

# Partie 1

## Synthèse bibliographique

## I. Généralités sur la Melisse

### I.1. Description botanique

La mélisse, dont le nom scientifique est *Melissa officinalis* L., est une plante herbacée vivace appartenant à la famille des Lamiaceae (anciennement Labietaceae) (Bardeau, 2009). Elle possède des racines fines, cylindriques, dures et fibreuses (Bardeau, 2009). Elle se développe en touffes mesurant entre 30 et 80 cm de hauteur. Ses tiges, de forme quadrangulaire, sont ramifiées, très feuillues, velues au niveau du sommet et près des nœuds, mais glabres sur le reste de leur longueur (Baba aissa, 1999 ; Girre, 2001).

Les feuilles, opposées deux à deux, sont ovales à base cordiforme, munies d'un pétiole, à nervures bien marquées et à bords crénelés. Elles sont d'un vert foncé sur leur face supérieure et plus claires au revers. Lorsqu'on les froisse, elles dégagent une agréable odeur citronnée (Bianchini et Corbetta, 1975).

Les fleurs apparaissent de la fin juin à septembre. Elles sont regroupées par 3 à 12 en glomérules axillaires situés à l'aisselle des feuilles supérieures, toutes orientées dans la même direction. En bouton, elles sont jaunes, puis deviennent blanches, rosées ou bleu pâle à maturité (Bianchini et Corbetta, 1975 ; Bartels, 1998). Le calice, d'environ 8 mm de long, est tubuleux, presque en forme de cloche (campanulé), bilabié avec cinq dents (deux inférieures et trois supérieures). La corolle, soudée en un seul pétale (monopétale), prend la forme d'un cylindre évasé à son extrémité et porte de petits poils dispersés.

Le fruit est un tétrakène aromatique, contenant quatre petites graines luisantes de couleur brun foncé (Achour et Bougaci, 2008 ; Girre, 2001).



**Figure 01** : *Melissa officinalis* L. (Adimi,2001)

La mélisse est une vieille plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs (**Padrini et Lucheroni, 2003**). Elle est originaire de la région méditerranéenne orientale. La mélisse pousse à l'état spontané dans les pays chauds (**Hayon, 2007**). C'est une plante commune dans toute l'Algérie, où on la retrouve dans des lieux incultes, ombragés, sur les terrains riches en humus, en marge des forêts et aux bords des chemins jusqu'à 1000 mètre d'altitude ainsi qu'aux alentours des maisons (**Dellile, 2007**). Elle est aussi largement cultivée dans les régions de la Kabylie néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du Tell. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen (**Halimi, 2004 ; Beloued, 2005**).

## I.2. Classification botanique

- Nom scientifique : *Melissa officinalis* L.
- Nom commun : Mélisse officinale, Mélisse Citronnelle ou simplement Citronnelle, Ifer tzizwa (Bérbere - Kabyle), Trandjane (Arabe).

### Systematique

- Règne : Plante
- Sous-règne : Trachéobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Melissa*
- Espèce : *Melissa officinalis* L.

## I.3. Les principaux constituants de la Mélisse

La plante de mélisse fraîche est composée de 0,2% d'huile essentielle au maximum (**Larousse des plantes médicinales, 2001**). L'Huile essentielle de mélisse est constituée de :

- Aldéhydes terpéniques (citronellal et citral, un mélange de néral et de géranial) ;
- Alcools terpéniques (eugénol, géranol, citronellol, linalol) ;

Les autres composants de la mélisse sont :

- Acides phénols (acide rosmarinique, acide chlorogénique, acide caféique) ;
- Tri-terpènes (acide ursolique et oléanique, acide hydroxyoléanolique) ;
- Flavonoïdes (dérivés de la lutéoline et du quercétol) ;
- Coumarines ;
- Tanins (les dérivés hydroxycinnamique) ;
- Mucilages uroniques

#### **I.4. Les principaux effets de la Mélisse**

La mélisse est une plante aux effets relaxants, antispasmodiques, antiviraux et digestifs ; elle aide à calmer le stress, soulage les crampes, favorise la transpiration et l'élimination des gaz (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

## II. Métabolites secondaires de *Melissa officinalis*

Les métabolites secondaires de *Melissa officinalis* L sont des composés bioactifs synthétisés par la plante, qui ne sont pas directement impliqués dans ses fonctions vitales telles que la croissance ou la reproduction. Toutefois, ils jouent un rôle clé dans les mécanismes de défense de la plante ainsi que dans ses interactions avec l'environnement. Parmi ces substances figurent principalement les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les huiles essentielles, largement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires.

### II.1. Composés phénoliques de *M. officinalis*

#### II.1.1. Définition

Également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement. Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques, avec ou pas d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle) (**Shahidi et Ambigaipalan 2015**). Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidins) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (**Beta et al., 2005**).

#### II.1.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols se répartissent selon leur caractéristique structurale dans différentes familles : anthocyanes, coumarines, flavonoïdes, tanins, quinones, acides-phénols, xanthones. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 Dalton (**Harborne, 1993**).

Ces substances jouent un rôle important en agroalimentaire dans la préservation des aliments et contribuent en médecine à la prévention des maladies chroniques en combattant le stress oxydant (**Meddour et al.,2013**).

##### II.1.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances polyphénoliques naturels (**Seyoum et al., 2006**), ils sont présents dans tous les organes et principalement dans les feuilles et les boutons floraux. Ils jouent un rôle aussi très important pour la santé humaine, dans la croissance des plantes, la floraison, et la défense contre les différentes maladies et les micro-organismes.

Ils se répartissent en plusieurs classes telles que : flavones, aurones, flavonones, flavonols , flavononols , flavanes , anthocyanines et anthocyanidines (**Péroumal,2014**).

#### **II.1.2.2. Acides phénoliques**

L'huile essentielle (jusqu'à 0,8 %), contenant des aldéhydes monoterpéniques à odeur citronnée (géraniol, néral et citronellal), des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (4 à 7 %) aussi appelés « tanins des Lamiacées », dont le principal est l'acide rosmarinique, des acides triterpéniques (acides ursolique et oléanolique).

La Pharmacopée européenne exige que la feuille de Mélisse séchée doit contenir au minimum 4 % de dérivés hydroxycinnamiques totaux exprimés en l'acide rosmarinique. Ce composé phénolique est indiqué pour le traitement des affections cutanées comme l'herpès labial (Herpès simplex) grâce à ses propriétés anti oxydantes et antivirales. La Mélisse officinale constitue une source naturelle majeure d'acide rosmarinique par sa teneur élevée (6 % des feuilles sèches) par comparaison aux autres lamiacées (**Wichtl et Anton, 2003**).

#### **II.1.2.3. Les coumarines**

Les coumarines sont des esters internes des acides composés. Ce sont des lactones phénoliques, qu'on trouve dans de nombreuses espèces végétales (**Oullai et Chamek, 2018**). Les coumarines de toutes sortes possèdent des propriétés curatives très diverses (**Iserin, 2001**). Des études d'activité biologique antérieures réalisées sur des dérivés de coumarine ont révélés que ces composés ont des effets anti-tumoraux, anti-VIH, antibactériens et antifongiques, anti-inflammatoires, anticoagulants, abaissant les triglycérides et stimulants du système nerveux central. On observe néanmoins une activité antioxydante marquée et une protection efficace contre le stress oxydatif (**Akkol et al., 2020**).

#### **II.1.2.4. Tanins**

Les tanins sont des mélanges complexes de polyphénols. Le principe actif est un phénol qui se combine avec les sucres se trouvent dans le cytoplasme des cellules végétale, dans les vacuoles à tanins, ont la capacité de coloration brun rouge dans les organes qui les contiennent (**Volak et Stodola,1983**).

### II.1.2.5. Anthocyanosides

Les anthocyanosides sont des pigments colorés présents dans les fleurs et les fruits, responsables de leurs teintes vives. Ils dérivent du cation flavylum et attirent les pollinisateurs comme les insectes et les oiseaux (**Bruneton, 1993 ; Brouillard et al., 1997**).

### II.1.2.6. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5 diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactives (**Cowan, 1999**).

## II.2. Utilisation de la mélisse

### II.2.1. Utilisation traditionnelle

**1. Thérapeutique** : la mélisse (*Melissa officinalis*. L) est utilisée pour soulager l'anxiété avec troubles cardiaques ou digestifs (**Bernard, 2012**), ainsi que les affections nerveuses, gastriques et bronchiques (**Grünwald et Janicke, 2006 ; Jorg et Janicke, 2007**). Elle possède des propriétés stomachiques, antispasmodiques et sédatives (**Delille, 2007 ; Valnet, 1983, 1990 ; Thurzova, 1981**), et protège contre le vieillissement cellulaire (**Bernard, 2012**). Elle est efficace chez l'enfant pour les troubles du sommeil, digestifs et les vomissements (**Bernard, 2012 ; Delille, 2007 ; Thurzova, 1981**), et soulage les piqûres d'insectes (**Boullard, 2001**). En infusion, elle combat les maux de tête et les infections hivernales (**Isrin, 1997**), et possède des effets antiviraux, notamment contre l'herpès (**Koytche et al., 1999**). Son huile essentielle est analgésique, antibactérienne, antifongique et calmante pour le système nerveux et digestif (**Boullard, 2001 ; Hayon, 2007**).

**2. Domaine culinaire** : **Bartels (1998)** souligne que les feuilles fraîches de mélisse dégagent un arôme subtil et citronné, qui apporte une touche raffinée aux préparations culinaires telles que les salades, les sauces ou encore les plats de légumes, en rehaussant délicatement leurs saveurs sans les masquer.

**3. Domaine agricole** : toujours selon **Bartels (1998)**, la mélisse est particulièrement appréciée en agriculture pour ses qualités mellifères. Elle est souvent cultivée dans les régions

méditerranéennes, où les apiculteurs avaient pour habitude de frotter les feuilles de la plante sur les ruches. Ce geste traditionnel permettait de diffuser son parfum attirant, favorisant ainsi l'installation de nouvelles colonies d'abeilles.

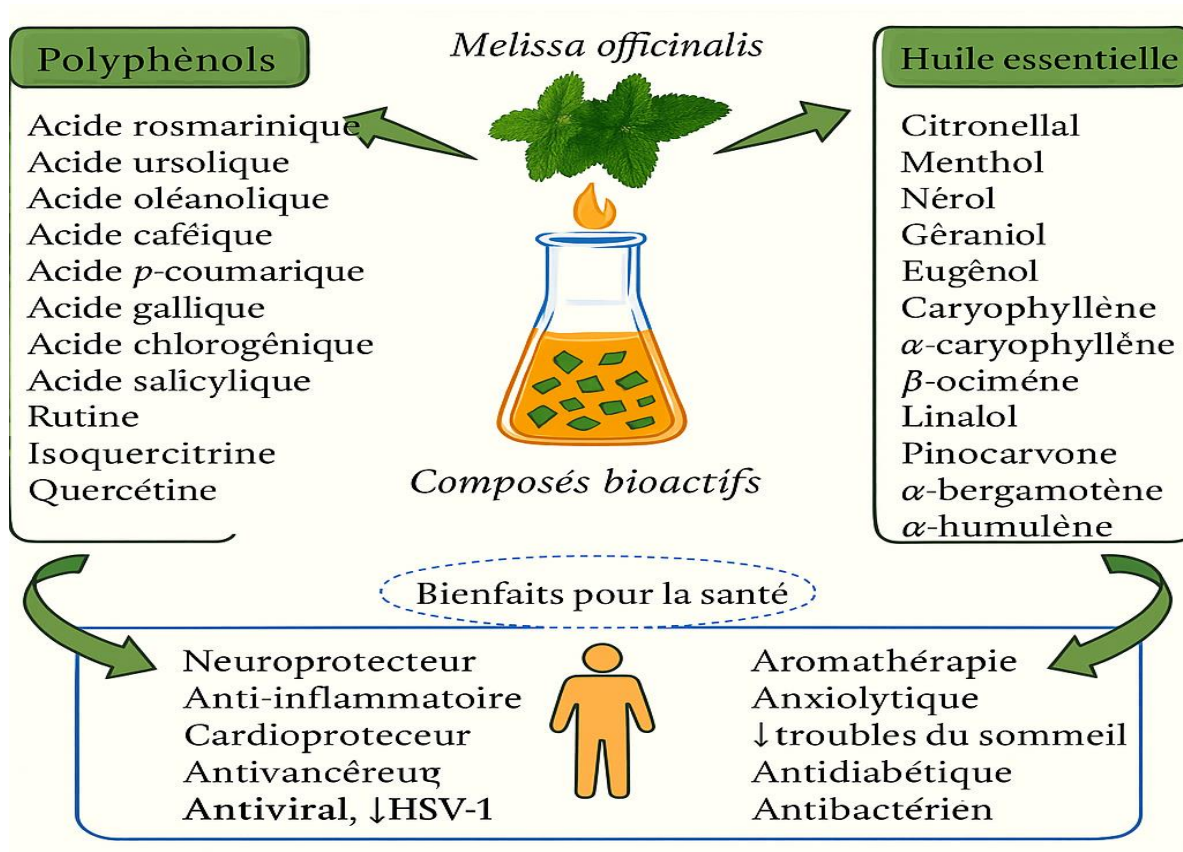
### **II.2.2. Utilisation industrielle dans le domaine agroalimentaire**

Le groupe scientifique ANS a évalué la sécurité des extraits de mélisse utilisés comme additifs alimentaires. Bien que la caractérisation chimique fournie soit limitée, le groupe note que la mélisse possède un historique d'utilisation sûre en tant qu'ingrédient alimentaire à base de plantes. De plus, ses extraits naturels sont généralement reconnus comme sûrs GRAS "Generally Recognized As Safe".

L'exposition moyenne potentielle aux phénols des extraits d'origan ou de mélisse provenant de huit catégories de sources alimentaires pour lesquelles l'utilisation et les niveaux d'utilisation ont été proposés par le pétitionnaire s'élevait respectivement à 2,0 mg/kg pc/jour pour les femmes et à 2,3 mg/kg pc/jour pour les hommes (**Aguilar, F et al., (2010)**).

### III. Les activités biologiques

Les propriétés biologiques de la mélisse peuvent être associées à la présence et à l'action combinée de composés bioactifs tels que les terpénoïdes, l'acide rosmarinique et les antioxydants phénoliques. Les composés bioactifs les plus importants de la mélisse officinale et leur corrélation avec les activités biologiques sont présentés dans la figure 2.



**Figure 02** : activités biologiques de la mélisse (Świąder et al., 2019).

#### III.1 Activité anti oxydantes

En raison de sa teneur élevée en flavonoïdes, la mélisse officinale possède des propriétés anti oxydantes. Des études in vitro ont confirmé que 100 à 500  $\mu$ g/ml d'extrait hydro-éthanolique de la plante avaient une activité cyto-protectrice contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. L'extrait a également réduit la quantité de peroxyde d'hydrogène dans les fluides intra et extracellulaires. Les propriétés anti-oxydantes ont également été confirmées dans l'étude portant sur le personnel

de radiologie exposé à long terme à de faibles doses de rayonnements ionisants. Ils ont consommé une infusion de mélisse (1,5 g de feuilles séchées) deux fois par jour pendant une période de 30 jours. On a constaté une amélioration significative de l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase dans le plasma, ainsi qu'une réduction des dommages à l'ADN, de la peroxydation des lipides et de l'activité de la myéloperoxydase. La supplémentation en mélisse peut fournir une protection adéquate contre les radiations à faible dose (**Świąder et al., 2019**).

### **III.2. Activité anti microbienne**

La mélisse présente un large spectre d'activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique et antivirale), principalement due à ses huiles essentielles et à ses composés phénoliques comme l'acide rosmarinique. Son action antivirale contre le virus de l'herpès (**Shakeri et al., 2016**).

**1. Propriété Antifongique :** La mélisse a aussi prouvé son efficacité contre divers champignons et levures, dont *Candida albicans*, un agent pathogène fréquent. Encore une fois, les éléments de l'huile essentielle ont un rôle crucial (**Mimica-D, et al., 2004**).

**2. Activité Antivirale :** C'est l'un des domaines de recherche les plus approfondis concernant la mélisse. Elle est surtout reconnue pour sa performance contre le virus de l'herpès simplex (HSV-1 et HSV-2), qui est à l'origine de l'herpès buccal et génital. Il semble que des composés tels que l'acide rosmarinique et d'autres polyphénols présents dans les extraits aqueux ou alcooliques entravent la capacité du virus à infecter les cellules hôtes.

#### **III.2.1. Activité anti bactériennes**

Les polyphénols, dont les flavonoïdes sont les représentants majeurs, sont largement responsables des effets antimicrobiens de *Melissa officinalis* L. Cette plante médicinale, riche en composés phénoliques tels que l'acide rosmarinique, la quercétine, la lutéoline ou encore la catéchine, a démontré une activité antibactérienne notable, en particulier contre les bactéries à Gram positif. Plusieurs études ont mis en évidence que ces composés agissent par divers mécanismes : inhibition des enzymes bactériennes (comme l'ADN gyrase), perturbation de la synthèse de l'ADN/ARN, et altération de la perméabilité membranaire (**Cushnie et Lamb, 2005**). Par exemple, la quercétine, abondante dans la mélisse, est capable de perturber la membrane cellulaire bactérienne et d'inhiber la réplication de l'ADN, ce qui entraîne une inhibition de la croissance microbienne. Les ptérocarpanes et certains flavanones, aussi présents dans les extraits de mélisse, présentent une activité bactériostatique particulièrement marquée

contre les souches Gram positives comme *Staphylococcus aureus* (**Jimenez-Gonzalez et al., 2008**). L'efficacité de ces composés semble fortement liée à la présence de groupements hydroxyles libres, notamment en position 2' et 5, tandis que les groupements méthoxyles réduisent leur action antibactérienne (**Cushnie et Lamb, 2005**). Enfin, les polyphénols de la mélisse ont également montré des effets contre des souches résistantes, comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA). Ces effets sont en partie dus à des modifications structurales spécifiques, comme des prénylations ou des hydroxylations multiples (**Botta et al., 2009 ; Halbwirth, 2010**).

# Partie 2

## Partie pratique

## **Objectif de l'étude**

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de trois méthodes d'extractions (extraction aqueuse, hydro-éthalonique et par la méthode de soxhlet) sur les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes, et d'évaluer l'efficacité des extraits contre différentes souches bactériennes et fongiques.

## **I. Matériel végétal**

### **I.1. Matériel biologique**

Le matériel végétal utilisé dans cette étude correspond à la partie aérienne de l'espèce *Melissa officinalis* L, récoltée dans la commune de Draa El Mizan de Tizi-Ouzou, le mois de février 2025. La plante a été d'abord lavée puis séchée à l'ombre, et conservée dans des sacs en plastique à la température ambiante, et à l'abri de la lumière.

### **I.2. Matériel non biologique**

Le matériel et les appareils utilisés sont présentés dans l'annexe I.

### **I.3. Préparation des extraits de Mélisse**

Le séchage de la plante (feuilles- tiges) a été effectué naturellement à l'abri de la lumière sur du papier blanc dans un endroit bien aéré durant 15 jours afin d'éviter la photo- oxydation des substances (**Guignard, 2000 ; Delille ,2007**). Après le séchage les feuilles ont été broyées à l'aide d'un moulin à café pour l'obtention d'une poudre fine, qui a subi un tamisage pour séparer les particules trop grossières. Cette dernière est conservée dans un flacon en verre opaque bien fermé et conservé jusqu'à l'utilisation.

### **I.4. Méthodes d'extractions**

#### **1. Extraction aqueuse**

Les infusions fraîches sont préparées en faisant macérer la substance brute pendant une courte période dans l'eau chaude. Il s'agit de solutions diluées des constituants facilement solubles de la drogue brute (**Handa et al.,2008**).

#### **Mode opératoire**

10g de la poudre de mélisse ont été pesés, puis mélangés avec 100 ml de l'eau distillée chauffée à une température de 80 °C, on agite la solution à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min, puis on laisse infuser pendant 24 H. On applique ensuite une double filtration

avec du papier Wattman n°1, On récupère le filtrat qui est séché à 40°C à l'étuve. Après le séchage on récupère l'extrait sec.



**Figure 03 :** Etapes de l'extraction par infusion de la mélisse officinale (original)

## 2. Macération hydro-éthanolique

### Principe

L'extraction des métabolites secondaires se fait par macération dans l'objectif de réduire la dégradation des molécules présentes dans la plante. Le broyat est macéré dans le solvant hydro-éthanolique durant 24 heures. Une fois la macération terminée le mélange est filtré sur papier Wattman et concentré par séchage (**Koné,2018**).

### Mode opératoire

Un mélange de 5 g de poudre sèche de la plante a été mis en contact avec de l'éthanol à 70 %. Le mélange a été soumis à une agitation pendant 5 minutes, puis laissé au repos pendant 24 heures à l'abri de la lumière, afin de favoriser l'extraction des composés bioactifs. Après cette période de macération, l'extrait a été filtré deux fois. Un second lavage du résidu solide a également été effectué afin de maximiser le rendement d'extraction. Les deux filtrats obtenus ont été regroupés, puis soumis à un séchage à 40 °C pendant 24 à 48 heures. L'extrait sec obtenu a ensuite été récupéré et conservé pour les analyses ultérieures.

## 3- Extraction par soxhlet

Une quantité de 250 ml d'éthanol à 70% est placée dans le ballon et 20g de poudre de la plante dans une cartouche en cellulose, le tout est placé dans l'appareil de soxhlet, et porté à ébullition à 65°C jusqu'à évaporation de l'éthanol et formation des cycles pendant 6 h. Après

on laisse refroidir à température ambiante avant la filtration. Le filtrat est séché à 40°C pendant 24 – 48 h pour récupérer l'extrait sec.



**Figure 04 :** Extraction de la poudre de la mélisse par soxhlet (original)

### II.1. Calcul de rendement

Pour le calcul de rendement on utilise la relation entre le poids de l'extrait brut et le poids de la plante séchée en poudre, le rendement est exprimé en pourcentage (%) par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut.

PA : poids de la plante séchée en poudre

### II.2. Taux de cendre

La teneur en cendres correspond à la fraction minérale restante après incinération complète de la matière organique de l'échantillon dans un four à haute température.

Selon la méthode décrite par l'AOAC (1990), 3 g de poudre sèche de *Melissa officinalis* ont été préalablement pesés dans un creuset propre et calciné. L'échantillon a ensuite été placé dans un four à moufle, maintenu à une température de  $550 \pm 25$  °C pendant 4 heures, jusqu'à obtention de cendres de couleur blanche ou gris clair, témoignant de la combustion complète de la matière organique. Après refroidissement dans un dessiccateur, le résidu minéral a été pesé. Le taux de cendre a été exprimé en pourcentage de matière sèche selon la formule suivante :

$$\text{cendre total\%} = \frac{\text{poids des cendre}}{\text{poids initial}} \times 100$$

### II.3. Taux d'humidité

Dans des caissettes d'aluminium peser 2-5g de poudre, placer dans une étuve à 105C° pendant 24h, refroidir dans un dessiccateur, pesez puis refaire l'opération jusqu'à obtention d'un poids constant (AOAC.,1990). Le taux d'humidité exprimé en pourcentage (%) par la formule suivante :

$$H\% = \frac{\text{poids initial} - \text{poids apres sechage}}{\text{poids initial}} \times 100$$

### III.1. Dosage des polyphénols totaux

#### Principe

La détermination des polyphénols totaux est réalisée par la méthode spectrophotométrie en utilisant le Folin –Ciocalcu. Ce dernier qui est un acide jaune composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lors de l'oxydation des substances phénoliques, le réactif est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ), réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

#### Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Kim et ses collaborateurs., (2003) avec une légère modification. Une quantité de 100 µl de l'extrait convenablement dilué dans l'EtOH 80% est mélangée avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalcu (10 fois dilué) fraîchement préparé. Après 5 minutes, une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7 % (1 ml) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée par 400 µl d'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement. Après une incubation de 90 min dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

(Shimadzu UV-19001), contre un blanc (le même mélange excepté l'extrait qui est remplacé par 100 µl d'éthanol 80%) par la suite, une courbe standard d'étalonnage par l'acide gallique à différentes concentrations (0-200 µg/ml). La teneur en polyphénols est exprimée en mg EAG/g MS.

## **II.2. Dosage des flavonoïdes**

### **Principe**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée par spectrophotométrie (**Quettier-Deleu et al., 2000**), en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, dont le maximum d'absorbance se situe à 430 nm.

### **Protocole**

La méthode décrite par Quettier –Deleu et ses collaborateurs, (2000) est adoptée pour déterminer la teneur en flavonoïdes dans cette étude avec quelques modifications.

Pour la préparation de la solution mère de l'extrait végétal, 10 mg d'extrait sec de *Melissa officinalis* ont été dissous dans 10 ml d'eau distillée ou d'éthanol à 80 %. Parallèlement, la solution mère standard de quercétine a été préparée en dissolvant 5 mg de quercétine dans 5 ml d'éthanol à 80 %. À partir de cette solution, une gamme d'étalonnage a été réalisée en préparant des solutions filles de concentrations comprises entre 10 et 100 µg/ml. Pour le dosage des flavonoïdes, 1 ml de l'extrait dilué a été mélangé avec 1 ml de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 2 %, puis incubé à l'abri de la lumière pendant 15 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un blanc a été préparé dans les mêmes conditions, le volume d'extrait étant remplacé par 1 ml d'éthanol à 80 %.

## **III. L'activité antimicrobienne de *Melissa Officinalis*. L**

Pour cette partie nous aborderons l'étude de l'effet antimicrobien des extraits des plantes de *Melissa Officinalis* L en testant l'effet de ses polyphénols et les flavonoïdes.

### **III.1. Réception des souches :**

Nous avons utilisé les souches suivantes :

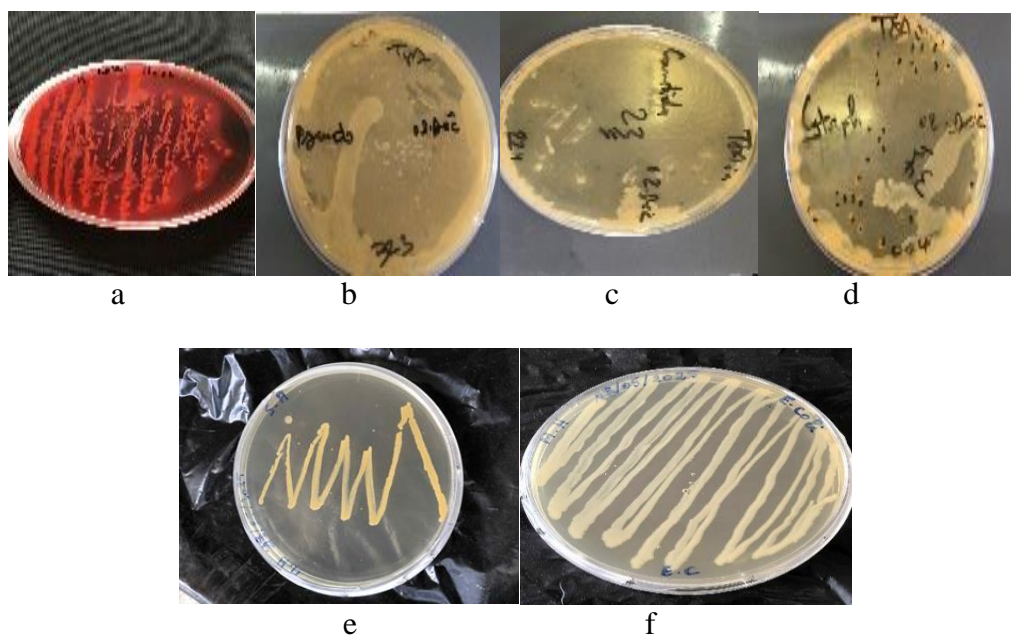
-Escherichia coli ATCC 4157

-Staphylococcus aureus ATCC 6538

-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

-*Candida albicans* ATCC 24433

Ces souches (voir la figure ci-dessous) nous ont été fournies par le laboratoire de notre faculté de l'UMMTO. Deux autres souches isolées à partir du poulet frais ont été aussi utilisées dans cette étude. Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*.



**Figure 05 :** Photos des différentes souches utilisées (a : *Escherichia coli*, b : *Pseudomonas aeruginosa*, c : *Candida albicans*, d : *Staphylococcus aureus*, e : *Staphylococcus aureus* isolé et f : *E.coli* isolé)

### III.1.1. Revivification des souches

Se réalise dans un bouillant BHIB, par une sélection de quelques colonies depuis des précultures des souches étudiées, puis incubé à 37°C pendant 18- 24h.

Après 24 heures d'incubation, l'apparition de troubles dans les bouillons indique une croissance microbienne. Des prélèvements sont alors réalisés et ensemencés sur des milieux sélectifs adaptés : Chapman pour *Staphylococcus*, Hecktoen pour *Escherichia coli*, gélose nutritive pour *Pseudomonas*, et Sabouraud pour *Candida*. L'incubation est poursuivie à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

### III.1.2. Coloration des souches

Se fait par la coloration des frottis peut être simple ou différentielle.

**Coloration simple** recouvrir le frottis par quelques gouttes de colorant en le laissant pour quelques secondes, puis on rince à l'eau, l'examen s'effectue généralement à l'aide de l'objectif à immersion, après séchage à la flamme du bec.

**Coloration différentielle** plus connue est celle de gram, permet de distinguer les bactéries en deux grands groupes gram+ et gram-. Celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool sont Gram+. Celles qui sont décolorées et prennent la couleur d'un second colorant sont Gram-.

Comme le protocole représenté dans l'annexe II le montre.

### III.1.3. Test de catalase

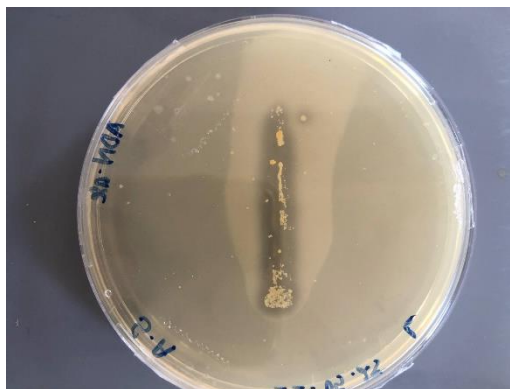
La présence de catalase est expérimentalement démontrée en mélangeant quelques colonies de chaque souche étudiée avec quelques gouttes de l'eau oxygénée ; s'il y a présence de catalase on constate un phénomène d'effervescence au niveau de l'échantillon.

### III.1.4. Test d'oxydase

Se fait à l'aide d'un disque oxydase + déposé sur une lame porte-objet, et imbibé d'eau distillée, puis mettre dessus une colonie en la frottant légèrement au disque avec une pipette pasteur. Après quelques secondes on observe apparition ou absence d'une coloration indiquant que la souche est oxydase + ou -.

### III.1.5. Test de DNase

Se fait par un ensemencement d'une colonie de *Staphylococcus aureus* sur une gélose de Mueller Hinton (MH) sous forme d'une ligne horizontale au milieu de la boîte, puis incubé à une température de 37°C pendant 18-24h. Après incubation, ajouter une petite quantité de HCL 1N pour voir s'il y aura apparition d'une zone d'inhibition.



**Figure 06 :** Identification des *Staphylococcus aureus* : test ADN ase

### III.2. Technique d'antibiogramme

#### 1.Méthode de diffusion sur milieux gélosé : (méthode des disques)

La technique des disques de diffusion, basée sur le principe de l'antibiogramme, permet d'évaluer de manière qualitative la sensibilité d'un micro-organisme à une substance antimicrobienne. Des disques stériles en papier Wattman (diamètre :6 mm), imprégnés de 20  $\mu$ l d'extrait à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur un milieu gélosé adapté, préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne standardisée. Après une phase de diffusion à température ambiante durant 20 minutes, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'apparition éventuelle de zones d'inhibition autour des disques permet d'estimer l'activité antimicrobienne des extraits testés.

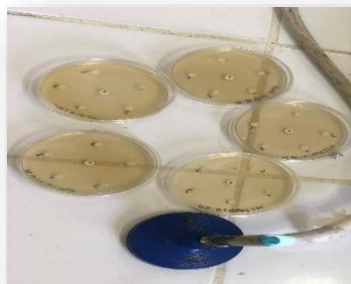
#### 2.Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure âgée de 18 heures sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées et morphologiquement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse stérile, puis suspendues dans 10 ml de solution physiologique stérile. La suspension bactérienne est homogénéisée soigneusement. La densité de l'inoculum a été ajustée conformément au standard de McFarland 0,5 de turbidité par dilution ou ajout de culture selon les besoins.

#### 3.Ensemencement et application des extraits

La suspension bactérienne est étalée de manière homogène sur la surface de la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile. Sur chaque boîte de Pétri, six disques de papier sont disposés de façon équidistante. À l'aide d'une micropipette, des volumes de 20  $\mu$ L d'extraits testés, correspondant à différentes concentrations ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  et une solution saturée),

sont déposés sur quatre disques, tandis que le cinquième disque est traité avec du DMSO pour les extraits hydro-éthanolique et l'extrait de soxhlet, servant de témoin négatif et le sixième centré au milieu de la boîte comme un disque d'antibiotique servant de témoin positif. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures.



**Figure 07** : Technique d'antibiogramme sur milieu gélosé des différentes souches.

#### 4.Lecture des résultats

L'activité antibactérienne de composées de la plante est évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition formées autour des disques, zones où aucune croissance bactérienne n'est visible. La taille de ces zones (D) reflète l'efficacité des extraits de la plante contre les souches testées. Les résultats sont interprétés selon les critères suivants :

- **Souche résistante** :  $D < 8$  mm
- **(+) Souche sensible** :  $9 \text{ mm} \leq D \leq 14$  mm
- **(++) Souche très sensible** :  $15 \text{ mm} \leq D \leq 19$  mm
- **(+++)** **Souche extrêmement sensible** :  $D > 20$  mm

**Tableau I : Caractéristiques des souches microbiennes testées**

Souche	N°ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées	Milieu de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	-Infection urinaires -Gastro-entérites	Mueller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	-Diarrhées dysentériques -Gastro-entérites	Mueller Hinton
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	-Crampes abdominales -Troubles digestifs	Mueller Hinton
<i>Candida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae	-Lésions cutanées -Infection génitales	Sabouraud

### III.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a pour objectif de déterminer l'efficacité d'un extrait ou d'un composé contre un micro-organisme, et d'estimer la dose minimale nécessaire pour l'inhibition de sa croissance suivant les étapes ci-dessous

-Préparer la suspension microbienne (*Staphylococcus aureus* isolé et *Pseudomonas aeruginosa* ayant abouti à des zones d'inhibition indiquant une activité antimicrobienne efficace) dans le BHIB et ajuster la densité optique à DO= [0.08 – 0.1] à 625nm.

-Un prélèvement de 100 µl de la suspension déjà préparée et ajouter dans 9.9ml de BHIB pour obtenir une concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

-Préparer les dilutions des extraits (HE et Soxhlet) dans les puits de la plaque :

Mélanger 50µl de DMSO avec la solution saturée dans le premier puits, réaliser des dilutions successives par l'ajout de 50µl du mélange précédent + 50µl de DMSO, ainsi de suite pour les dilutions 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/16.

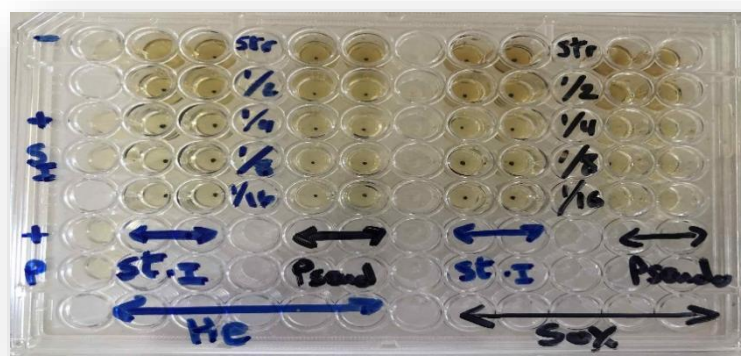
Ajouter 50µl de la suspension bactérienne dans chaque puits contenant les dilutions des extraits.

Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures, après 24 heures ajouter 30µl de la résazurine (0.0015%) dans chaque puits, incuber une deuxième fois pendant 2 à 3 heures à 37°C.

La lecture se fait par une observation de la couleur :

**Bleu/violet** : inhibition de la croissance bactérienne.

**Rose** : présence de croissance



**Figure 08** : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode en microplaque.

# Résultats et discussions

## I. Résultats des analyses physico-chimiques

### 1. Teneur en cendre et en humidité de la poudre de la mélisse officinale

Les teneurs en humidité et en cendres de la poudre obtenue après séchage de la plante sont présentées dans le tableau II.

**Tableau II** : Teneurs en cendres et en humidité de la poudre de la mélisse officinale

Paramètre	Taux (%)
Humidité	6,66±3.21
Cendres	16,92±0.26

Comme le montre les résultats des analyses, une teneur en humidité de 6,05%, correspond à une teneur en matière sèche de 93,95%. La teneur en humidité est un paramètre important pour évaluer la qualité et la stabilité des produits végétaux. Une humidité excessive peut favoriser le développement microbien, les altérations enzymatiques et la dégradation des composés bioactifs comme les flavonoïdes et les substances volatiles. **Haiani, (2015)** a trouvé une teneur d'humidité de 7,23% pour la Mélisse officinale. Cette différence peut être assignée aux conditions de séchage et à la température qui ne sont pas les mêmes.

La teneur en humidité des poudres des plantes médicinales, comme la mélisse, doit rester inférieure à 10–12 % pour garantir la stabilité et préserver les composés actifs sensibles tels que le citral et l'acide rosmarinique (**Rodrigues-das-Dores et al.,2018**).

La teneur en cendre de la poudre de la mélisse a été évaluée à 16,92%. Cette valeur correspond à des **résidus minéraux non combustibles**, une valeur supérieure à celles rapportées dans la littérature, généralement autour de **12 %**. Cette différence peut être liée à une forte teneur naturelle en minéraux.

### 2. Le rendement en composés actifs des 3 types d'extraction

D'après les résultats présentés dans le tableau IV, nous pouvons déduire que le rendement le plus élevé a été obtenu par la méthode d'extraction par infusion avec de l'eau chaude (80°C) suivie par la méthode hydro-éthanolique avec un rendement de 17% et enfin l'extraction par la méthode de Soxhlet avec un rendement de 4,31%.

**Tableau III** : Rendement des 3 types d'extraction de la mélisse

Type d'extrait	Poids brut (g)	Poids d'extrait (g)	Rendement (%)
Aqueux	10	2,4±0.2	24±2
Hydro-éthanolique	5	0,85±0.01	17±0.2
Soxhlet	20	0,86±0.04	4,31±0.15

Le rendement d'extraction est défini comme le rapport quantitatif entre la masse de composés photochimiques isolés par action d'un solvant donné et la teneur totale théorique de ces composés dans la biomasse végétale initiale. Ce paramètre est influencé par divers facteurs physico-chimiques, notamment la polarité et la sélectivité du solvant, la température d'extraction, la durée du contact solvant-matrice, le pH du milieu, ainsi que la nature et la complexité de la matrice végétale (Do Quy Diem et al., 2014).

Cette différence peut s'expliquer par la capacité de l'eau chaude à solubiliser efficacement un large spectre de composés hydrosolubles naturellement présents dans la matrice végétale.

Il est important de souligner que l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant ne renferme pas exclusivement des composés phénoliques ou flavonoïdiques. Il comprend également d'autres métabolites secondaires ou primaires, notamment des glucides, des acides aminés, des protéines, des tanins hydrolysables ou encore des acides organiques (Békro et al., 2007 ; Kebièche et al., 2011). Ces composés, particulièrement solubles dans l'eau chaude, peuvent être extraits en plus grande quantité lors de la décoction, ce qui contribue à l'augmentation du rendement global.

La température élevée utilisée dans cette méthode favorise la rupture des structures cellulaires et augmente la diffusion des solutés vers le solvant, améliorant ainsi l'efficacité de l'extraction. Ce phénomène est bien documenté dans la littérature, notamment dans les cas où la matrice végétale est riche en composés hydrophiles (Quy Diem Do et al., 2014).

Toutefois, un rendement élevé ne reflète pas nécessairement une forte concentration en composés bioactifs spécifiques. Il convient donc de compléter l'évaluation quantitative par des analyses qualitatives (tests de criblage phytochimique, dosage des polyphénols totaux, etc.) afin de déterminer la nature chimique des substances extraites. Une telle approche permet une

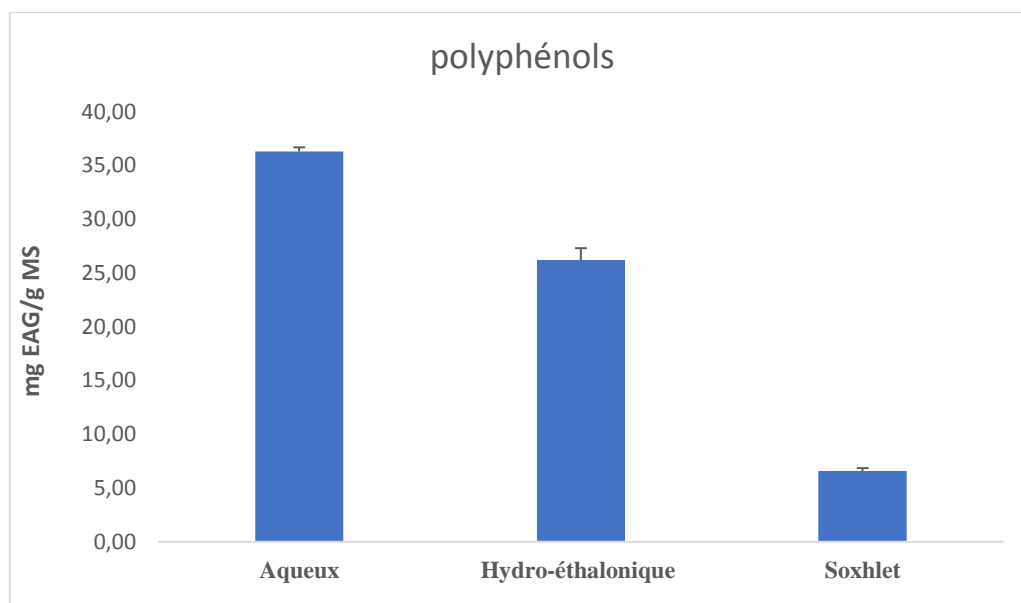
interprétation plus précise de la pertinence biologique ou pharmacologique de chaque méthode d'extraction.

### 3. La teneur en polyphénols totaux (PPT)

La teneur en polyphénols totaux (PPT) de *Melissa officinalis* dépend de plusieurs paramètres, notamment le solvant, la température et le temps d'extraction. La polarité du solvant influence la solubilité des polyphénols, tandis qu'une température et un temps adaptés permettent d'optimiser leur extraction tout en limitant leur dégradation.

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure dans les annexes 3 et les résultats de dosage des polyphénols sont déterminés à partir de la droite de la courbe d'étalonnage.

Comme le montre la figure 10, les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS), conformément à l'équation de régression linéaire établie à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



**Figure 09 :** Teneurs en polyphénols de *Melissa officinalis*.L.

Les teneurs moyennes en polyphénols dans l'extrait de *Melissa officinalis* sont de 36,32±0,38 mg EAG/g ; 26,20±1,11mg EAG/g ; et 6,59±0,25mg EAG/g pour l'extrait aqueux, l'extrait hydro-éthanolique et l'extrait obtenu par la méthode de soxhlet respectivement.

L'étude comparative des différentes techniques d'extraction sur la mélisse a permis de relativiser l'influence significatif de la nature du solvant utiliser et du procédé d'extraction sur le rendement en composés phénoliques. D'après les résultats obtenus, l'extrait aqueux présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux, suivi par l'extrait hydro-éthanol, tandis que l'extrait Soxhlet à l'éthanol présente la teneur la plus faible.

Ces résultats s'accordent avec les travaux de **Ben Aicha (2012)**, qui ont montré une teneur importante en polyphénols dans la *M.officinalis* estimée à  $118.62 \pm 6.57$  mg EAG/g. Par contre, les résultats obtenus par **Bouihi (2016)**, avec une concentration de 23.53 mg EAG/g sont significativement plus faible que ceux de la littérature pour la composition phénolique de cette plante.

Dans une autre étude comparative de **Brahmi (2015)** la teneur en polyphénols totaux la plus levée est attribuée à l'échantillon séché à l'air libre  $120.485 \pm 20.965$  mg EC/g. Par rapport à l'échantillon séché à  $40^{\circ}\text{C}$ , la teneur est de  $102.115 \pm 4.245$  mg EC/g, suggérant que les conditions de séchage douces préservent d'avantage les composés phénoliques.

Nos résultats vérifient également des données de la littérature de ce qui concerne l'efficacité des solvants utiliser lors d'extraction. C'est le cas des études réalisées par **Sahreen et al (2010)** et **Bouزيد et al (2011)** qui ont montrées que l'éthanol et l'eau et leurs mélanges à différents ratios constituent des solvants de choix d'extraction des polyphénols.

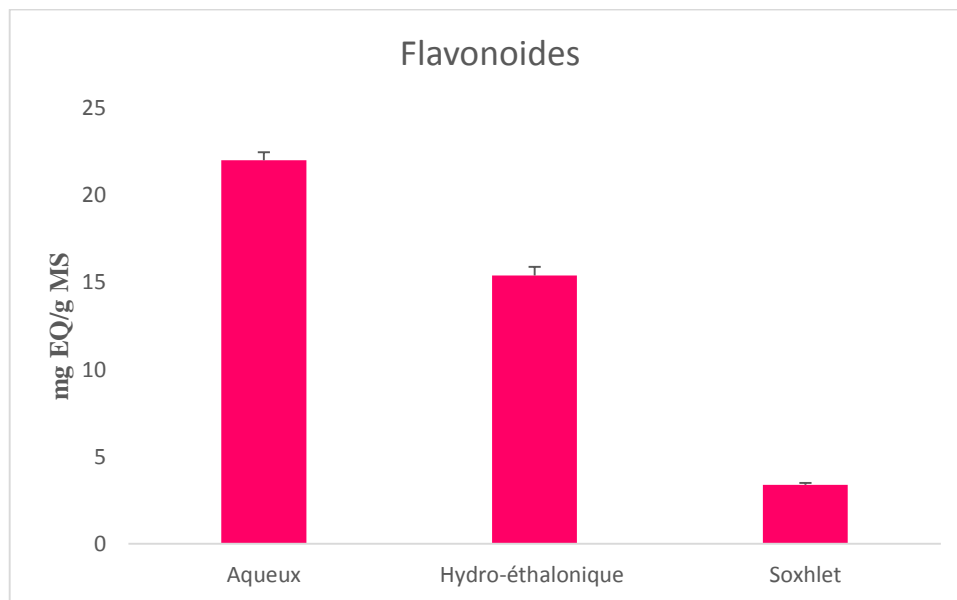
De manière générale, le rendement obtenu est plus faible par rapport aux résultats des autres expériences, cette différence de rendement en extrait sec varie d'une plante à l'autre en fonction de plusieurs paramètres d'extraction, tels que la température, le type de solvant utilisé, la taille des particules de la poudre végétale et le coefficient de diffusion du solvant.

Nos résultats mettent en évidence l'importance du choix des conditions expérimentales, en particulier le solvant et le mode d'extraction, pour extraire le maximum en composés bioactifs, efficace et respectueux de l'environnement pour l'extraction des polyphénols de *Mélissa officinalis* L.

#### 4. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été estimée par la méthode colorimétrique de Chlorure d'aluminium. La courbe d'étalonnage de la Quercitine est représentée dans la figure représenter dans l'annexe 3 et les résultats de dosage des flavonoïdes sont déterminés à partir de la droite de la courbe d'étalonnage.

Comme le montre la figure 12 les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g), conformément à l'équation de régression linéaire établie à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine.



**Figure 10 :** Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Melissa officinalis*.L.

Les teneurs moyennes en flavonoïdes dans l'extrait de *Mélissa officinalis* L sont de 22.0.3±0.46mg EQ/g ; 15.40±0.50mg EQ/g ; et 3.38±0.11mg EQ/g pour l'extrait aqueux, l'extrait hydro-éthanolique et l'extrait obtenu par la méthode de soxhlet respectivement.

L'étude comparative des différentes techniques d'extraction sur *Mélissa officinalis* a permis de relativiser l'influence de la nature du solvant utilisé et du procédé d'extraction sur le rendement en flavonoïdes comme dans le cas des polyphénols. D'après les résultats obtenus, l'extrait aqueux présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes, suivi par l'extrait hydro-éthanolique, tandis que l'extrait soxhlet à éthanol présente la teneur la plus faible.

Ces résultats s'accordent avec les travaux de **Gaaloul et al (2022)** qui ont montré une teneur très faible en flavonoïdes dans la Mélisse officinale tunisienne estimée de 0.026 et 0.023 mg EQ/g. Pareille pour les résultats obtenus par **Nefza et Tabarka (2023)** qui sont de l'ordre de 0.026 et 0.023 mg EQ/g RS.

Nos résultats vérifient également des données de la littérature de ce qui concerne l'efficacité des solvants utilisés lors de l'extraction. C'est le cas des études réalisées par **Sahreen et al (2010)** sur les extraits hydro-méthanoliques de plantes médicinales qui ont montrées des teneurs

entre 10 et 25 mg EQ/g RS ; aussi ont montrées que l'eau et l'éthanol et leur mélange à différents ratios constituent des solvants de choix d'extraction des flavonoïdes.

Dans notre cas on remarque que la mélisse officinale a une teneur plus élevée en polyphénols que les flavonoïdes, mais comparant avec les résultats des autres travaux pour les flavonoïdes notre plante a donnée des résultats plus élevés.

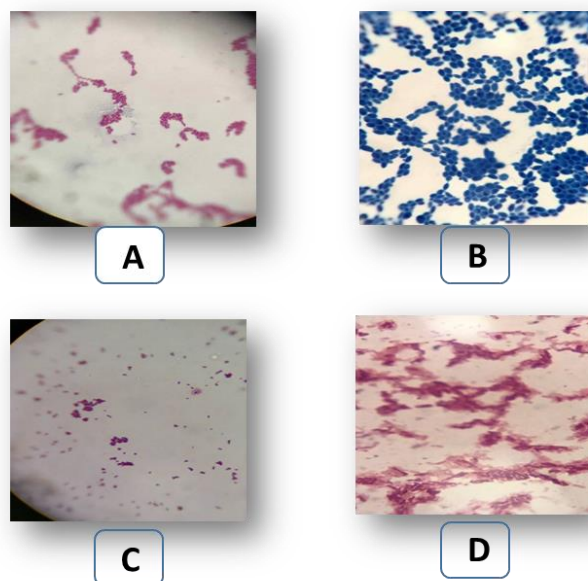
## II. Résultats des analyses microbiologique

### 1. Aspect morphologique des bactéries

Cette étape correspond à une observation microscopique des différentes souches utilisées pour but de déterminer leur forme, leur arrangement et leur taille, après une coloration appropriée, permettant ainsi de distinguer des cocci, bacilles, et d'autres structures bien spécifiques comme le montre le tableau V et la figure ci-dessous.

**Tableau IV :** Résultats des observations microscopique concernant les souches utiliser.

Microorganisme	Morphologie des colonies	Catalase	Oxydase
<i>Escherichia coli</i>	Rose, bacille (forme bâtonnet), disposition isolée et parfois courtes chaines, gram-	Positif + Produit des bulles avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Négatif – Pas de changement de couleur
<i>Staphylococcus aureus</i>	Violet/bleu foncé, forme sphérique (Cocci), la disposition en amas grappes de raisin, gram+	Positif +	Négatif -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rose, bacille, disposition isolée ou courtes chaines, mobile, gram -	Positif	Positif Changement de couleur
<i>Candida albicans</i>	Bleu-violet, ovalaire, vraies hyphes, gram+	Positif	Négatif Pas de cytochrome oxydase



**Figure 11** : A : *Escherichia coli* ; B : *Candida albicans* ; C : *Staphylococcus aureus* ;  
D : *Pseudomonas aeruginosa* sous microscope optique (original)

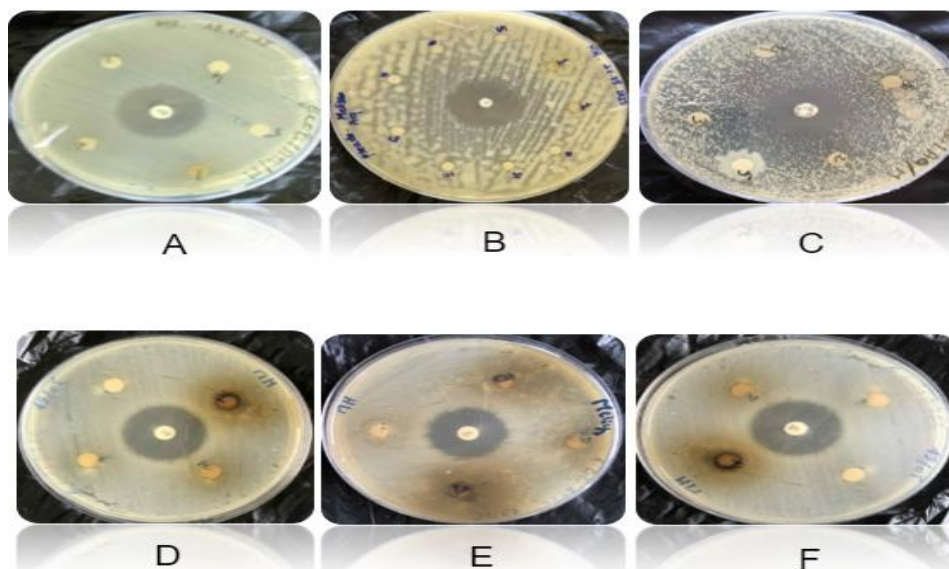
## 2. Les antibiogrammes

Le test est réalisé pour l'objectif de déterminer la sensibilité ou la résistance des souches aux différents extraits de la mélisse et aux antibiotiques comme témoins positifs en observant la zone d'inhibition ou de croissance autour des disques déposés sur le milieu de Mueller Hinton (MH) ensemencé avec la bactérie, et les résultats sont exprimés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau V** : résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *M.officinalis.L*

Souche	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition $\pm$ écart type (en mm)						
	dilution 1	dilution 2	dilution 3	dilution 4	eau/DMSO	antibiotique utilisé	Diamètre d'antibiotique
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	Gentamicin	20
<i>Staphylococcus</i> ATCC	0	0	0	0	0	Chloramphénicol	24
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	9 $\pm$ 0	8 $\pm$ 0	8 $\pm$ 0	0	0	Gentamicin	39
<i>E. coli</i> isolé	0	0	0	0	0	Gentamicin	20
<i>Staphylococcus</i> isolé	0	0	0	0	0	chloramphénicol	24

<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	Ketoconazole	20
-------------------------	---	---	---	---	---	--------------	----



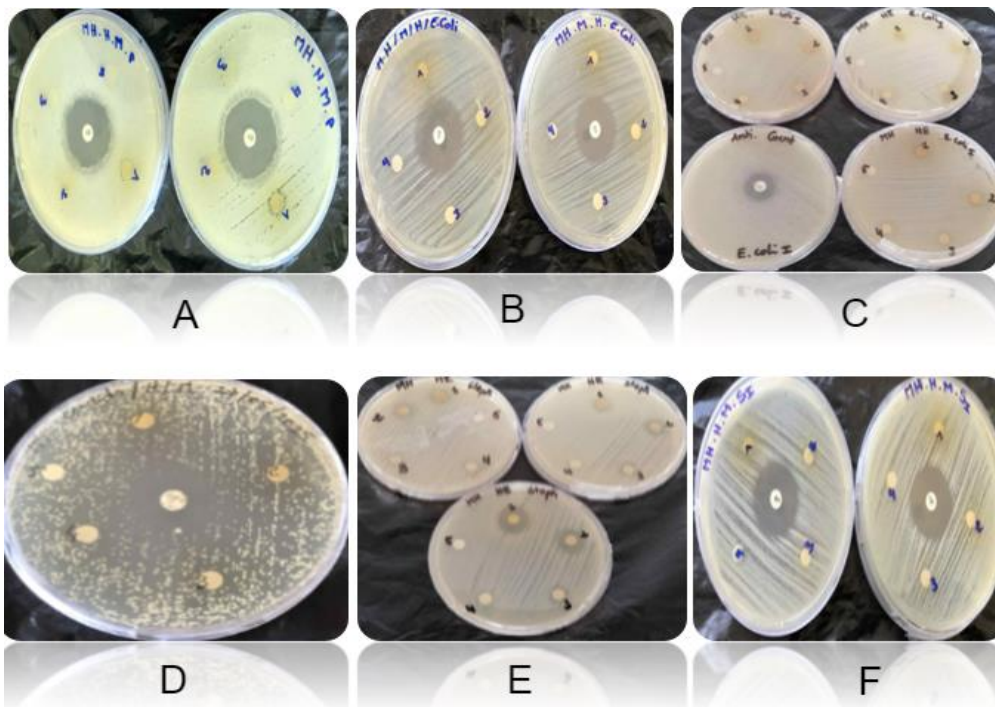
**Figure 12 :** Résultats d'antibiogramme sur l'extrait aqueux (A : *E.coli* isolé ; B : *Pseudomonas* ; C : *Candida albicans* ; D : *Staphylococcus* ATCC ; E : *E.coli* ATCC ; F : *Staphylococcus* isolé )

Au vu des résultats résumés dans le tableau V, on constate que les composés de la mélisse présentent une absence d'activité inhibitrice vis-à-vis les souches de *E.coli* ATCC et *E.coli* isolé et les *Staphylococcus aureus* ATCC et *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* isolé , mais une légère activité inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres de 9mm, 8mm et 8mm pour les concentrations de 200 mg/ml, 100mg/ml et 50mg/ml respectivement.

Le résultat de l'activité antimicrobienne des différentes dilutions de l'extrait hydro-éthaloniques sont exprimés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau VI :** résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de *Melissa officinalis* L.

Souche	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition $\pm$ écart type (en mm)						Diametre d'anti-biotique
	dilution 1	dilution 2	dilution 3	dilution 4	eau/ DMSO	antibiotique utilisée	
<i>E. coli</i>	6 $\pm$ 0	0	0	0	0	Gentamicin	26
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	12.67 $\pm$ 2.52	9.67 $\pm$ 2.52	0	0	0	Chloramphé nicol	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 $\pm$ 0	8 $\pm$ 0	0	0	0	Gentamicin	29
<i>E. coli</i> isolé	0	0	0	0	0	Gentamicin	26
<i>Staphylococcus aureus</i> isolé	17 $\pm$	9 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0	0	0	Chloramphé nicol	24
<i>Candida albicans</i>	10 $\pm$ 1.41	10	9	0	0	Ketoconazol e	19



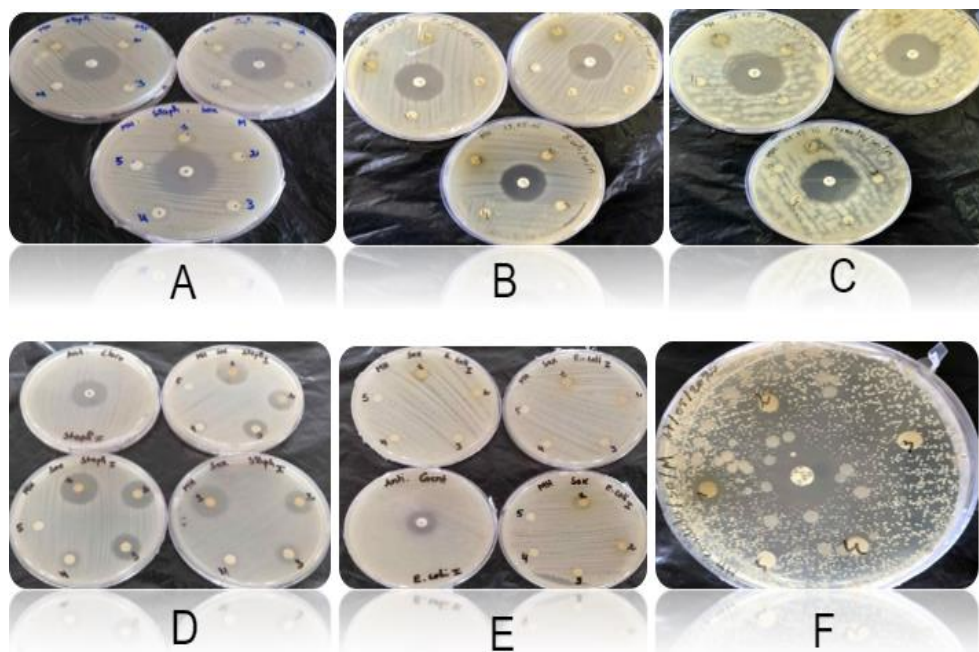
**Figure 13 :** Résultats d'antibiogramme sur l'extrait hydro-éthanolique (A : *Pseudomonas aeruginosa* ; B : *E. coli* ATCC ; C : *E. coli* isolé ; D : *Candida albicans* ; E : *Staphylococcus aureus* ATCC ; F : *Staphylococcus aureus* isolé )

Comme le montre le tableau VI, les résultats d'antibiogramme de l'extrait hydro-éthanolique, les composés de la mélisse présentent une absence d'activité inhibitrice vis-à-vis *E.coli* ATCC et *E.coli* isolé et une forte activité inhibitrice a été enregistrée pour les *staphylococcus aureus* isolé. Les diamètres sont de 17,9 et 7 mm pour les concentrations 62.25, 31.125 et 15.562 mg/ml respectivement, tandis qu'une activité modérée a été enregistrée par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* indiquant des valeurs de  $12.67 \pm 2.52$  et  $9.67 \pm 2.52$  mm et entre 10 et 8 mm respectivement, suivie par *Candida albicans* avec des zones de  $10 \pm 1.41$ , 10 et 9 mm pour les concentrations (62.25, 31.125 et 15.562 mg/ml).

Le résultat de l'activité antimicrobienne des dilutions de l'extrait obtenu par la méthode de soxhlet est présenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau VII** : résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de soxhlet *Melissa officinalis.L*

Souche	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition $\pm$ écart type (en mm)						
	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	eau/D MSO	antibiotique utilisé	diamètre d'antibiotique
<i>E. coli</i> ATCC	7 $\pm$ 0	0	0	0	0	Gentamicin	25
<i>Staphylococcus</i> ATCC	10 $\pm$ 0	0	0	0	0	Chloramphénicol	30
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	10.33 $\pm$ 0.58	7.33 $\pm$ 1.53	0	0	0	Gentamicin	32
<i>E. coli</i> isolé	0	0	0	0	0	Gentamicin	24
<i>Staphylococcus</i> isolé	14 $\pm$ 1	0	0	0	0	Chloramphénicol	29
<i>Candida albicans</i>	10.33 $\pm$ 0.58	7.33 $\pm$ 1.53	0	0	0	Ketoconazole	20



**Figure 14 :** Résultats d'antibiogramme sur l'extrait de soxhlet (A : *Staphylococcus* ATCC ; B : *E.coli* ATCC ; C : *Pseudomonas aeruginosa* ; D : *Staphylococcus* isolé ; E : *E.coli* isolé ; F : *Candida albicans* ).

Pour l'extrait de soxhlet comme le montre le tableau VII, la plus forte activité inhibitrice a été enregistrée par *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de  $14 \pm 1$  mm pour la concentration la plus saturé (71mg/ml), suivie par *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* avec le même diamètre de  $10.33 \pm 0.58$  mm pour les concentrations de 71 et 35.5 mg/ml, tandis que *E.coli* et *E.coli* isolé sont résistants.

D'après les résultats obtenus, on déduit une différence importante de l'activité antibactérienne et antifongique entre les différents types d'extraits de la mélisse officinale préparés par une macération hydro-éthanolique et ceux obtenus par une extraction de soxhlet. Les résultats de l'extraction hydro-éthanolique a mis en évidence une activité antibactérienne plus active, en particulier contre les *Staphylococcus aureus* isolé, avec des diamètres de zones d'inhibition atteignant 17mm pour la concentration la plus élevée (71.5mg/ml), contre 14mm pour l'extrait de soxhlet à 71mg/ml. Cette efficacité accrue peut être attribuée à la préservation de composés bioactifs sensibles à la chaleur, susceptibles d'être dégradés par l'extraction de soxhlet qui utilise une température élevée (Dai et Mumper ; Chemat et al.,2012).

Face au *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, les 2 types d'extraits ont montré une activité moyenne, avec des zones d'inhibition

qui varie entre 10 et 12 mm, sans écart entre les méthodes d'extraction. Cette concordance des activités laisse penser que les composés responsables de l'effet antimicrobien conservent leur intégrité thermique ou sont présents en quantités adéquates dans les deux extraits.

En revanche, aucune activité inhibitrice n'a été détectée pour les deux extraits vis-à-vis des souches d'*Escherichia coli* (ATCC et isolé), ce qui suggère une résistance intrinsèque de cette bactérie Gram-négative aux composés extraits de la mélisse. Cette résistance probablement liée à la barrière sélective constituée par sa membrane externe (Nikaido,2003).

Ainsi, l'extrait hydro-éthanolique semble globalement plus efficace que celui obtenu par Soxhlet, notamment contre les bactéries Gram-positives. Cette différence souligne l'importance du choix de la méthode d'extraction, qui influence la composition qualitative et quantitative des métabolites secondaires, et donc leur activité biologique (Azwanida,2015).

Dans une étude comparative menée par Čanadanović-Brunet et al, (2008) ou ils ont montré que les extraits aqueux de *Melissa officinalis* ont une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de  $13,67 \pm 0,58$  mm, et aucune activité n'a été observée sur l'*Escherichia coli*. La résistance des bactéries gram négatif est probablement due à la membrane externe et l'étude de Stefanovic et Comic (2016) ont montré l'activité antibactérienne des extraits de *M. officinalis* L. à différentes concentrations, Ces teneurs varient de 5 mg/ml à 40 mg/ml. Les *Escherichia coli*, ont montré une faible sensibilité à l'extrait éthanolique et une activité synergique a été démontrée entre les antibiotiques et l'extrait de Melisse officinale en renforcent les activités d'amoxicilline, streptomycine, tétracycline et chloramphénicol. Ils ont signalé aussi que la quantité de composés phénoliques totaux est très élevée avec une concentration de 319,11 mg de GAE/g MS.

Une autre étude réalisée par Aissaoui,(2022) a montré que l'extrait aqueux de la *M. officinalis* d'une concentration de 0.2g/ml, a une activité antibactérienne vis à vis de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* à gram positif. La zone d'inhibition est de l'ordre de 09 mm Par contre, aucune activité n'a été observée vers la souche bactérienne *Escherichia coli* à gram négatif.

Dans une autre étude menée par Adimi (2018) où la mélisse du Maroc ne présente aucun effet sur la croissance de l'*Aspergillus niger*, alors qu'il inhibe la croissance de *Candida albicans*.

Suivi par une autre étude réalisée par **Albayrak1 et al (2013)**, ayant évalué les effets antibactériens de l'extrait de méthanol de *M. officinalis* contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 12 et 8 mm à une concentration de 50 mg/ml.

### 3. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

En utilisant la résazurine comme indicateur. Les résultats ont montré une absence de croissance bactérienne dans toutes les dilutions testées (de la solution saturée à 1/16), indiquant une forte activité inhibitrice de l'extrait, notamment contre *Staphylococcus* isolé et *Pseudomonas aeruginosa*. La CMI de l'extrait est inférieure ou égale à 4.437 mg/ml pour l'extrait de soxhlet et 3.89 mg/ml pour l'extrait d'hydro-éthanolique.

Cette efficacité est attribuée à la richesse de l'extrait en composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes et huiles essentielles, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ces résultats confirment également l'absence de résistance bactérienne observée jusqu'à la plus faible concentration testée.

Les données obtenues rejoignent celles de la littérature. Selon **Abdellatif et al. (2014)**, des CMI très faibles (1 à 5 µL/mL) ont été observées, traduisant une puissante activité antimicrobienne, avec *Salmonella enterica* identifiée comme la souche la plus résistante. D'autres travaux ont montré des CMI encore plus faibles, atteignant 0,12 mg/mL contre *Staphylococcus aureus* et 0,25 mg/ml contre *Escherichia coli*, tandis que *E. coli* s'est révélée plus résistante aux composés phénoliques et flavonoïdes de *M. officinalis* avec des CMI de 2 mg/ml (**Ehsani et al., 2017**).

# Conclusion

Les résultats obtenus montrent clairement que la méthode d'extraction joue un rôle déterminant dans la composition chimique des extraits végétaux. En effet, l'extrait aqueux obtenu par une macération aqueuse avec l'eau chaude a présenté une teneur plus élevée (24%) en composés phénoliques totaux par rapport à celui d'extrait hydro-éthanolique suivie par l'extrait de soxhlet.

D'autre part, biologiquement parlant, une activité antibactérienne a été observée surtout à l'égard des souches Gram-positives, telles que les *Staphylococcus aureus* et les *Pseudomonas aeruginosa* et aussi *Candida albicans*, avec des zones d'inhibition importantes. En revanche, aucune activité inhibitrice n'a été détectée contre les souches de *E.coli* ATCC et *E.coli* isolé, suggérant une résistance intrinsèque de ces bactéries Gram-négatives, peut être liée à leur paroi externe qui est moins perméable.

L'ensemble des résultats indique que l'extrait aqueux n'a pas présenté des activités antimicrobiennes, mais il est riche en composés phénoliques. Cependant, l'extrait hydro-éthanolique de la mélisse officinale est non seulement riche en composés phénoliques, mais également plus actif sur le plan antimicrobien et antifongique. Ces constats confirment la corrélation entre le solvant utilisé lors de l'extraction et la richesse en métabolites secondaires (notamment les polyphénols et les flavonoïdes) et l'activité biologique.

Afin de mieux évaluer la variabilité et l'efficacité des extraits, une détermination de la CMI a été réalisée par une microdilution en milieu liquide, par l'utilisation de la résazurine.

Toutefois, aucune concentration minimale inhibitrice n'a pu être déterminée pour les deux extraits hydro-éthanolique et soxhlet dans les conditions expérimentales utilisées. Cette absence peut être interprétée comme une activité inhibitrice partielle ou insuffisante à ces dilutions utilisées soit la concentration sub-inhibitrice des composés actifs, soit une faible diffusion dans le milieu.

Ce travail souligne donc l'importance du choix de la méthode d'extraction dans la valorisation des plantes médicinales.

Les extraits de mélisse offrent de nombreuses perspectives, notamment grâce aux nano-formulations qui améliorent leur stabilité et efficacité. L'extraction assistée par enzymes peut renforcer la libération des composés actifs, tandis que des études in vivo permettront de

valider leur efficacité. Ces extraits peuvent aussi servir dans des médicaments naturels contre les résistances aux antibiotiques ou comme conservateurs alimentaires naturels.

# Référence bibliographique

**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'Ingéniorat. USDB.38p.

**Adimi, L. Z.** (2001). Etude cinétique de la production de ferments lactiques (*Streptococcus Thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) sur un milieu à base de sous-produits de datte. Thèse de Magister. Université de Sétif, Algérie 77p.

**Alloun, K.** (2019). Composition chimique et activités biologiques de métabolites secondaires de *Crithmum maritimum* L., de *Melissa officinalis* L. et de *Thymus palleescens* de Noé et effet de l'irradiation gamma sur les huiles essentielles du thym (Doctoral dissertation).

**Aissaoui, A.** (2022). Valorisation de l'activité antibactérienne de cinq plantes locales.

**Aguilar, F., Charrondiere, U. R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Grilli, S., Guertler, R., Koenig, J., Lambré, C., Larsen, J.-C., Leblanc, J.-C., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I., Rietjens, I. M. C. M., Stankovic, I., Tobback, P., Verguieva, T., & Woutersen, R. A.** (2010). Scientific opinion on the use of oregano and lemon balm extracts as a food additive. *EFSA Journal on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)*, 8(2), 1514. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1514>

**Akkol, E. K., Ilhan, M., Karpuz, B., Genç, Y., & Sobarzo-Sánchez, E.** (2020). Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Current Medicinal Chemistry*.

**AOAC.** (1990). *Official Methods of Analysis* (15e éd.). AOAC, Arlington, VA.

**Azwanida, N. N.** (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength, and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.

**Baba Aissa, F.** (1999). *Encyclopédie des plantes utiles : flore d'Algérie et du Maghreb*. Edition Librairie moderne Rouïba. Alger.368p.

**Bardaud, F.** (2009). *La pharmacie du bon Dieu*. Éditions LANOR.

- Bartels, A.** (1998). Guide des plantes du bassin méditerranéen. Éditions Eugen Ulmer.
- Békro, Y. A., Békro, J. A. M., Boua, B. B., Tra Bi, F. H., & Ehilé, E. E.** (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. Et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217–225.
- Bekut, M. ; Brkić, S. ; Kladar, N. ; Dragović, G. ; Gavarić, N. ; Božin, B.** Potentiel de certaines plantes de lamiacées dans la thérapie anti(rétro)virale. *Pharmacol. Res.* 2018, 133, 301-314.
- Ben Aicha, B.** (2021). Impact cellulaire de lambda-cyhalothrine chez les rats Wistar... (Doctoral dissertation).
- Beloued, A.** (2005). Plantes médicinales d'Algérie (1re et 2e éd.).
- Bernard, A.** (2012). Les épices c'est malin. Éditions Quotidien Malin.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D.** (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390–393.
- Bianchini, F., & Corbetta, F.** (1975). *Atlas des plantes médicinales*. Éditions Nathan.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D., & Delle Monache, G.** (2009). Prenylated flavonoids: Pharmacology and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1679–1696. <https://doi.org/10.2174/092986709787846653>
- Boullard, B.** (2001). Plantes médicinales du monde : Croyances et réalités. Paris : Éditions ESTEM.
- Bouزيد, K., Toumi Benali, F., Chadli, R., Bouzouina, M., Bouزيد, A., Benchohra, A., ... & Dif, M. M.** (2014). Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from fruit extracts of *Arbutus unedo* L. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 6(4), 160–169. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2014.6.160> .
- Brahimi, F., Madani, K., & Chibane, M.** (2015). Impact du séchage conventionnel des feuilles de la mélisse officinale de la région de Bejaia sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante de leur extrait méthanolique.

**Brouillard, R., Delaporte, B., & Dubois, J. E.** (1997). Les anthocyanes : structure et rôle dans la nature. Paris : Collection Actualités Scientifiques.

**Bruneton, J.** (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (2e éd.). Paris : Lavoisier-Tec & Doc.

**Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., & Čanadanović, V.** (2008). Radical Scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*, Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.580>.

**Charpentier, B., Hamon-Lorléac'H, F., Harlay, A., Huard, A & Ridoux, L.** (1998). Guide du préparateur en pharmacie. Éditions Masson.

**Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G.** (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.

**Cowan, M. M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.

**Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J.** (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26(5), 343–356.

**Dai, J., & Mumper, R. J.** (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.

**Dar, R. A., Shahnawaz, M., & Qazi, P. H.** (2023). Exploring the diverse bioactive compounds from medicinal plants : A review. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(7), 3183–3197. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2130312>

**Dellile, L.** (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Éditions Berti.

**Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H.** (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total

flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.

**Gaaloul, N., Habaieb, H., Nasr, Z., Hachicha, M., Hlaoui, Z., Kharroubi, A., Boukchina, R., Hamdi, N., Hermassi, T., Sellami, M. H., Belaid, H., Katlane, R., Traoré, I. A., Meddi, M., Hani, A., Djabri, L., Rahmani, S. E. A., Djorfi, S., Achite, M., ... & Kallioras, A.** (2022). Actes de la Conférence Internationale ISC-WHC'2022.

**Girre, L.** (2001) : Les plantes et les médicaments (l'origine végétale de nos médicaments). Edition Nathalie, Paris.253p.

**Grunwald, J., & Janiche, C.** (2006). Le guide de la phytothérapie. Éditions Marabout.

**Guignard, J. L.** (1998, 2001). *Abrégé botanique & Botanique systématique moléculaire*. 11ème Ed Masson, Paris.

**Haiani, C.** (2015). Etude de quelques effets thérapeutiques de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*. Mémoire de master en biologie.

**Halbwirth, H.** (2010). The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 595–621. <https://doi.org/10.3390/ijms11020595>.

**Halimi, A.** (2004). Les plantes médicinales d'Algérie. Éditions Berti.

**Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D.** (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieste, Italy: International Centre for Science and High Technology, United Nations Industrial Development Organization (ICS-UNIDO), 260 p.

**Harborne, J., & Baxter, H.** (1993). *Phytochemical dictionary, hand book of bioactive compounds from plants*. Taylor et Francis, London, Washington.

**Hayon, F.** (2007). Les plantes médicinales qui nous soignent, tradition et thérapeutique.Éditions Ouest-France.

**Iserin, P.** (2001). Larousse des plantes médicinales. Éditions Larousse.

**Jimenez-Gonzalez, A., Gutierrez-Navarro., & Diaz-Molina, R. (2008).** Antimicrobial activity of pterocarpanes. *Fitoterapia*, 79(1), 10–20.

**Kebièche, N., Derdouri, F. Z., Bensalem, A., & Merah, O. (2011).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de deux plantes médicinales d'Algérie. *Revue des Bioressources*, 1(2), 1–10.

**Koné, K. P. F. (2018).** Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne. [Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny - Yamoussoukro]. <https://theses.hal.science/tel-02055347>.

**Koytchev, R., Alken, R. G., & Dundarov, S. (1999).** Balm mint extract for topical treatment of recurring herpes labialis. *Phytomedicine*, 6(4), 225–230.

**Larousse. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. Paris : Larousse, 335 p.

**Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S., & Kim, J. H. (2003).** Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(2), 167–179. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00213-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00213-9).

**Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi, A. (2013).** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*, 14(1) : 49-60.

**Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., & Simin, N. (2004).** Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2485–2489. <https://doi.org/10.1021/jf030698a>.

**Moradi, M. A., Karimi, A., Alidadi, S., & Hashemi, L. (2016).** *In vitro* anti-adenovirus activity, antioxidant potential and total phenolic compounds of *Melissa officinalis* L. (Lemon Balm) extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(9), 1471–1477.

**Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>.

**Oullai, L., & Chamek, C.** (2018). Contribution à l'étude ethnopharmacognosique des plantes médicinales utilisées pour le traitement des affections de l'appareil digestif en Kabylie. *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie.

**Padrini, F., & Lucheroni, M. T.** (2003). Le grand livre des huiles essentielles. Editions De Vecchi S.A., Paris. Dépôt légal : Avril 2006, 206p.

**Péroumal, D.** (2014). Caractérisation des fruits de la pulpe de six actions de *Mammea americana* : Aptitude à la transformation des fruits et caractérisation des composés phénoliques de la pulpe, Université des antilles et de la Guyane ,83 p.

**Rodrigues-das-Dores, R. G., Xavier, F., Marques, F. de S., Finger, F. L., Wagner, V., & Casali, D.** (s. d.). Evaluation of the storage and drying processes of *Melissa officinalis* L. leaves.

**Sahreen, S., Khan, M. R., & Khan, R. A.** (2010). Effect of solvent polarity on extraction of phenolic compound and antioxidant activity: A case of *Chenopodium album* L. *Food Chemistry*, 118(4), 906–910.

**Seyoum, A., et al.** (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058–2070.

**Shahidi, F., & Ambigaipalan, P.** (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.

**Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B.** (2016). *Melissa officinalis* L.: A review study with an antioxidant prospective. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>.

**Świąder, K., Wijaya, C. H., & Startek, K.** (2019). The therapeutic properties of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Reviewing novel findings and medical indications. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 327-335 Pages. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2019.092.044>

**Thurzova, L., Sabrier, D., Devroye, C., Symones, M., & Fasbender, B. (1985).** *Les plantes-santé...* Elsevier, Bruxelles.

**Valnet J, (1983)** : La phytothérapie Traitement des maladies par les plantes 5° édition, Editions Maloine, 280pp. 140-VALNET J, 1990 : L'aromathérapie Traitement des maladies par les essences des plantes 10° édition, Editions Maloine 267PP.

**Volak, J., & Stodola, J. (1983).** *Plante médicinale.* Grund, Paris.

**Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S., & Niciforovic, N. (2009).** Antimicrobial activity of the essential oil... *Journal of Medicinal Food*, 12, 435–441.

**Wichtl, M., & Anton, R. (2003).** *Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique (2° éd.).* Paris : Tec & Doc – Lavoisier.

# Les annexes

**Annexe 1 : Listes des appareils et matériels, de la verrerie et des produits**

<b>Matériel et appareils</b>	<b>Produits</b>
<b>Matériel :</b>	
-Mélisse officinale	-Acide gallique
-Papiers filtre	-Ethanol
-Papiers aluminium	-Quercitine
-Papiers film	-Eau distillé
-Gants stériles	-Tube de bouillant nutritif
-Micropipettes (1000 ;500 ;100 µl)	-Gélose nutritive
-Cartouche cellulosique	-Gélose Chapman
-Tubes à essai stériles	-Gélose Saboureu
-Flacons ECBU	-Gélose Hektouen
-Pissette	-Gélose Mueller Hinton
-Passoire	-Souches bactériennes
-Thermomètre	-Chlorure d'Aluminium
-Boîtes de pétri	-Disque d'Antibiotiques
-Flacons stériles	-Disque de papier filtre
-Masques chirurgical	-Eau oxygénée
-Bécher	-HCL
-Erlenmeyer	-Bleu de méthylène
-Entonnoir	-Violet de Gentiane
-Verre à montre	-Huile de Cidre
-Burette graduée	- La fuschine
-Spatule	-Lugol
-Boîte de pétri	-Carbonate de Sodium
-Pipette	-Souches bactériennes :
-Anse à boucle	*E.coli,Staphylococcus,
-Seringue	Condida,Pseudomonas*
-Lame et lamelle	

**Appareils :**

- Spectrophotomètre
- Etuve
- Plaque chauffante
- Bain marie
- Soxhlet
- Balance de précision
- Agitateur
- Bec benzène

**Annexe 2**

**Coloration de Gram**

**Mode opératoire :**

-Faire un frotti, en déposant une goutte d'eau puis sélectionner une colonie et la frotter avec une boucle la déposer dans la goutte et bien l'étaler sur la lame, après le séchage de la lame recouvrir avec le violet de gentiane pendant 1 min puis laver avec de l'eau, puis on ajoute de Lugol et laisser 1 min puis laver avec alcool.

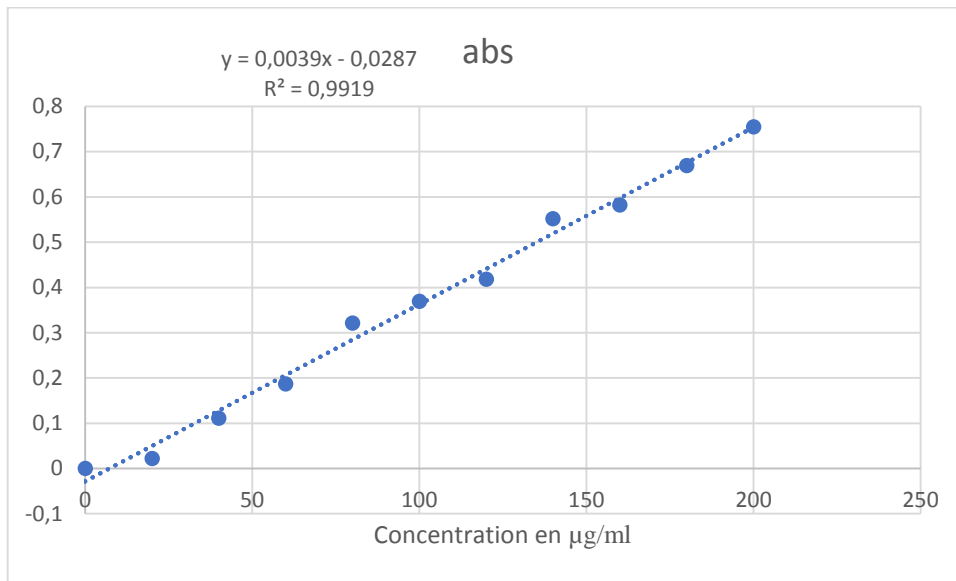
-Recouvrir avec la Fuschine de fiell et laver et sécher puis ajouter une goutte d'huile de cèdre puis observer sous microscope optique (gr 1000)

**Coloration au bleu de méthylène**

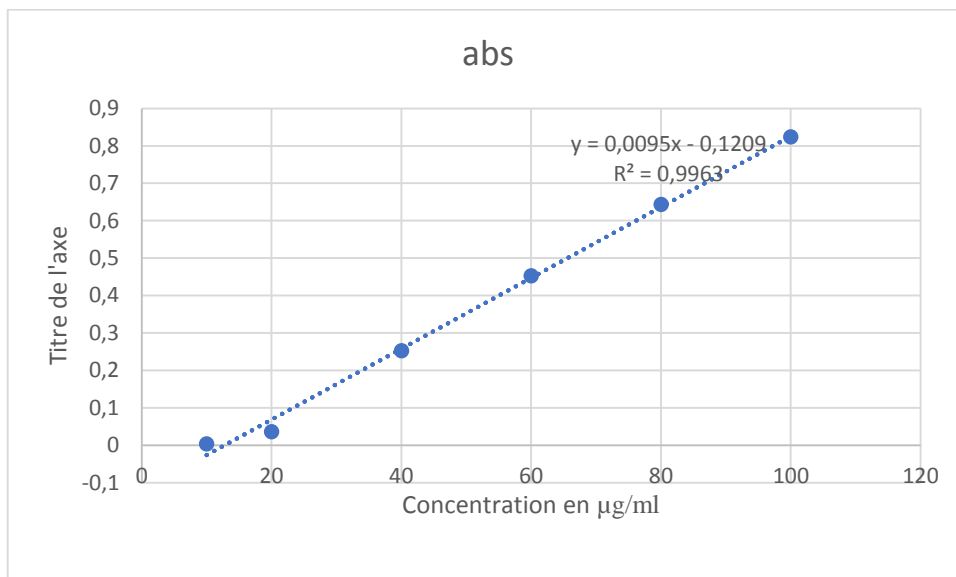
Pour les levures : Candida

Réaliser un frotti, sécher et fixer sur la lame, après le séchage recouvrir avec le bleu de méthylène et laisser 1 min puis rincer avec de l'eau distillé puis sécher et ajouter une goutte de l'huile de cèdre et mettre sous microscope optique.

**Annexe 3**



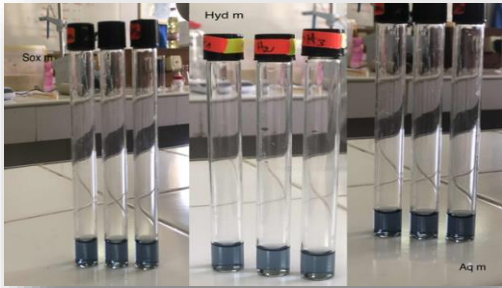
**Figure** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



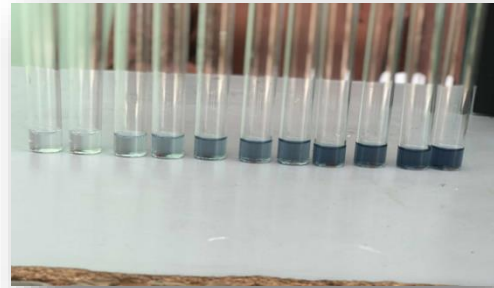
**Figure** : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes



**Figure** : Humidité et le cendre



**A** : Solutions mères (soxhlet/  
Hydro-éthanolique/aqueux)



**B** : Gamme d'étalonnage d'acide gallique



**C** : Spectrophotomètre UV

**Figure** : **A** et **B** représente le dosage des polyphénols



**Figure** : Spectrophotomètre des suspensions bactériennes et les souches bactériennes

## Résumé

La mélisse officinale (*Melissa officinalis* L.) est une plante médicinale reconnue pour ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence de différentes techniques d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antimicrobienne de cette plante.

Pour ce faire, des extraits ont été préparés par différentes méthodes, notamment l'extraction hydro-alcoolique et l'infusion aqueuse. Les extraits ont ensuite été soumis au dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, ainsi qu'à des tests d'activité antimicrobienne par la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats ont révélé que l'extraction hydro-alcoolique permet d'obtenir les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes, atteignant respectivement  $62,75 \pm 0,54$  mg EAG/g et  $28,46 \pm 0,81$  mg EQ/g d'extrait sec. Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits ont montré un effet inhibiteur plus marqué sur les souches de *Staphylococcus aureus* et de *Candida albicans*, avec des CMI allant de 1,25 à 5 mg/ml selon le micro-organisme testé.

Ces résultats confirment le potentiel de *Melissa officinalis* comme source naturelle de composés bioactifs à intérêt thérapeutique. Ils soulignent par ailleurs l'importance du choix des paramètres d'extraction pour optimiser la valorisation de cette plante dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire.

## Abstract

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a medicinal plant known for its antioxidant and antimicrobial properties. The aim of this study was to evaluate the influence of different extraction techniques on the phenolic compound content and antimicrobial activity of this plant.

To this end, extracts were prepared using various methods, including hydroalcoholic extraction and aqueous infusion. The extracts were then assayed for total polyphenols and flavonoids, and tested for antimicrobial activity using the minimum inhibitory concentration (MIC) method.

The results showed that hydroalcoholic extraction yielded the highest levels of polyphenols and flavonoids, reaching  $62.75 \pm 0.54$  mg EAG/g and  $28.46 \pm 0.81$  mg EQ/g dry extract respectively. In terms of antimicrobial activity, the extracts showed a more marked inhibitory effect on strains of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, with MICs ranging from 1.25 to 5 mg/ml depending on the micro-organism tested.

These results confirm the potential of *Melissa officinalis* as a natural source of bioactive compounds of therapeutic interest. They also highlight the importance of choosing the right extraction parameters to optimise the use of this plant in the pharmaceutical, cosmetics and agri-food sectors.

## الملخص

هو نبات طبي معروف بخصائصه المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات. (*Melissa officinalis* L.) بلسم الليمون كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير تقنيات الاستخلاص المختلفة على محتوى المركب الفينولي والنشاط المضاد للميكروبات لهذا النبات.

ولتحقيق هذه الغاية، تم تحضير المستخلصات باستخدام طرق مختلفة، بما في ذلك الاستخلاص المائي الكحولي والنقع المائي. ثم فُحصت المستخلصات بعد ذلك للكشف عن إجمالي مركبات البوليفينول والفلافونويد، واختبرت من أجل النشاط (MIC) المضاد للميكروبات باستخدام طريقة التركيز المثبط الأدنى.

أظهرت النتائج أن الاستخلاص المائي الكحولي أسفر عن أعلى مستويات من البوليفينول والفلافونويد، حيث بلغت 62.75  $\pm$  0.54 ملغم من البوليفينول والفلافونويدات/غرام و 28.46  $\pm$  0.81 ملغم من المكافئ الكهرومغناطيسي/غرام من المستخلص الجاف على التوالي. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات، أظهرت المستخلصات تأثيراً مثبطاً أكثر وضوحاً على سلالات المكورات العنقودية الذهبية والمبيضات البيضاء، حيث تراوحت نسبة التركيز الميكروسكوبي المتوسط بين 1.25 إلى 5 ملغم/مل حسب الكائن الحي الدقيق الذي تم اختباره.

تؤكد هذه النتائج إمكانات الميليسا المخزنية كمصدر طبيعي للمركبات النشطة بيولوجياً ذات الأهمية العلاجية. كما تسلط الضوء على أهمية اختبار معايير الاستخلاص الصحيحة لتحسين استخدام هذا النبات في قطاعات الأدوية ومستحضرات التجميل والأغذية الزراعية.