

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE : DES SCIENCES

DEPARTEMENT : CHIMIE

N°/2019.....



DOMAINE : Sciences de la matière

FILIERE : Chimie

OPTION : Chimie Organique

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : Neche Zidouma

Intitulé

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile
essentielle de *Mélissa officinalis*

Soutenu le 21/07/2019 devant le jury composé de :

Mr. REFFAS Abdelbaki	Université de M'sila	Président
Mr. HAFFAR Hichem	Université de M'sila	Rapporteur
Mme. AKRIB Fadila	Université de M'sila	Co-rapporteur
Mr. LAIB Nouri	Université de M'sila	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements :

Je tenais tout d'abord à remercier DIEU le tout puissant et miséricordieux, qui j'ai donné la force, la patience, la santé, la volonté et le courage pour accomplir ce travail.

A mon encadreur,

M^R le docteur H. haffar.

Docteur au département de chimie- université de m'sila

Pole universitaire.

A mon encadreur,

Madame F. AKRIB

*Vous je fais l'honneur d'avoir dirigés
Et participés à ce travail. Merci pour vos conseils précieux
Ainsi que votre disponibilité.*

*Veillez trouver ici, l'expression de mes vifs
Remerciements et de ma profonde estime.*

A mon maitre et président de jury,

M^r le docteur A. RAFFAS

Amon examinateur,

M^r docteur N. LAIB

*Je vous remercie d'avoir pris de votre
Temps pour lire et juger mon travail.*

Au chef de département de chimie

Université de m'sila

Le pole universitaire

M^R A. DAKHOUCHE

A tous qui travail dans le laboratoire de chimie

Merci de votre aide et votre disponibilité.

À tous qui travail dans le laboratoire central

Des analyses (labo-bactériologique) de l'hôpital* EZZAHRAOUI* -M'sila.

Merci pour tous que vous me fournir pour finir mon travail pratique.

اهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

كل الحمد لله من بيده التواهي *** واليه اجتهادي واخلاصي الله ربي
ثم الصلاة على بعث رحمة للأنام *** ومن تعجز عن وصفه اقلامي محمد رسولي

اما بعد :

اهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع

الى من قال فيهما الرحمان (وقل ربي ارحمهما كما ربياني صغيرا)
الى أمي الغالية وابي العزيز اطال الله في عمرهما
الى من قال فيه الرسول (صلى الله عليه وسلم) لو كان أمرا أحدا ان يسجد لاحد لأمرت امرأة تسجد لزوجها
الى من كان سندا لي في السراء والضراء وكان له الفضل في اكمال مساري الدراسي زوجي العزيز مخلوفي بلباي
الى من قال الله فيهم اطال والبنون زينة الحياة الدنيا
الى قرة عيني بناتي أمينة، هالة وهبة الرحمان
الى من كان لهما الفضل في توجيهي وارشادي الاستاذة عقريب فضيلة والدكتور حفار
الى من قال فيها الرحمان واشدد به ازري
الى اختي وصديقتي نبيلة وزوجها عمر سرايشن واولادها محمد، قطر الندى، شمشن النهار و آدم
الى من كانت بجانبني وكان لها الفضل بعد الله في اتمام مذكري اختي الغالية مها صابرة وزوجها عادل
الى من كان لهم الفضل في الانطلاق في مذكري وكانو مصدر تشجيعي
الى اختي العزيزة خليصة وزوجها يوسف واولادها اسحاق، عبد الرحمان و صفية
الى آخر العنقود اختي المدللة خولة
الى كل اخوتي وأولادهم وزوجاتهم زهير وليد صلاح
الى عائلة زوجي أمي الثانية فتيحة بلباي شفاها الله وبناتها آسيا، مريم، رشيدة، وخديجة
الى من كانوا برفقتي اثناء العمل التطبيقي في المخبر من عمال المخبر المركزي بالمسيلة
وخاصة رشيدة خنساء سمية
الى زملائي وزميلاتي في تخصص كيمياء العضوية وخاصة اسيا، عفاف، امينة وزهرة
الى كل من جمعنتي بهم ذكريات رائعة

زيدومة

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Classification botanique de *Mélissa Officinalis*

Tableau II.1 : liste des souches microbiennes testées.

Tableau II.2 : représente la sensibilité des certains souches bactériennes aux antibiotiques

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : *Mélissa officinalis* (Originale, 2019).

Figure I.2 : Tige. *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

Figure I.3 : La feuille de *Mélissa Officinalis*(Originale, 2019).

Figure I.4 : Lafeuille. *Mélisse Officinalis* (Originale, 2019).

Figure I.5: Classes des constituants chimiques des huiles essentielles

Figure II.1 : *Melissa officinalis*. (Originale, 2019).

Figure II.2 : goggle map au niveau de région de la wilaya de M'sila(Maadid).

FigureII.3 : plante fraîche (Originale, 2019).

Figure II.4 : séchage de la plante (Originale, 2019).

Figure II.5 : Dispositif d'Extraction par hydrodistillation type Clevenger (Originale, 2019).

FigureII.6 : l'activité anti- bactérienne de HE de la *Melissa officinalis* (Originale, 2019).

Figure II.8 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

Figure II.7 : Exemple pour la lecture de l'aromatogramme.

Figure II.8 : Protocole de dilution de huile *Melissa officinalis*.

Figure III.1: Teneur en HE de la partie aérienne de la *Mélissa officinalis*.

Figure III.2 : Huile essentielle de *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

Figure III.3 : Diamètres des zones d'inhibition d'E.Col / l'antibiotique (GN10) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

Figure III.4: Diamètres des zones d'inhibition proteus vulgaris / l'antibiotique (GN10) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

Figure III .5 : Diamètres des zones d'inhibition de Staph. / L'antibiotique (GMI 15) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

Figure III .6 Zones d'inhibition de'antibiotique (GMI 15) (à droite), et l'HE à différentes concentration (à gauche) sur la *staphylococcus aureus*.

Figure III. 7 :Diamètres des zones d'inhibition de la levure condida albicans / les différentes

concentrations de HE de la Mélisse.

Figure III. 8 : Diamètres des zones d'inhibition de la levure *Candida albicans* / HE de la Mélisse.

Figure III.9 : Spectre ultraviolet-visible d'huile essentielle *Melissa officinalis*.

Figure III.10: Spectre infrarouge d'huile essentielle

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection.
.DMSO	Diméthylsulfoxyde.
E. col	Escherichia coli.
HE	Huile essentielle.
Stph	Staphylococcus aureus.
IR	Infra-Rouge.
UV	Ultra- Violet.
C	concentration
R	rendement
GNI15	Gentamicine 15µg

T_{ABLE} D_{ES} M_{ATIÈRES}

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 01

Chapitre I : GENERALITEES ET DEFINITIONS

I.1 MONOGRAPHIE DE LA PLANTE ETUDIEE	02
I.1.1 La famille Lamiaceae	02
I.1.2 Caractéristiques de la <i>Mélissa Officinalis</i>	02
a- Définition	02
b- Description morphologique	03
I.1.3 position systématique :	04
I.1.4 Répartition géographique	04
a- Répartition géographique et habitat	04
b- Culture et récolte	05
I.1.5 Usage médicinales et thérapeutique de la <i>Mélissa Officinalis</i>	05
a- Utilisation interne	05
b - Utilisation externe	05
c- Contre-indications	06
I.1.6 Composition chimique de la mélisse	06
I.2 GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES	06
I.2.1 Historique	06
I.2.2 Définition	06
I.2.3 Localisation	06

I.2.4 Composition et constituant chimique des huiles essentielles	07
I.2.5 Propriétés physico-chimiques et médicinal des huiles essentielles	08
I.2.6 Conservation des huiles essentielles	09
I.2.7 Activités biologiques des huiles essentielles	09
I.2.7.1 Activité anti-oxydante	09
I.2.7.2 Activité anti bactérienne	09
a- Composition chimique	09
b- Type de bactérie ciblé	10
c- Mode d'action des huiles essentielles	10
I.2.8 Identification et séparation eds huiles essentielles	10
I.2.9 Toxicité des huiles essentielles	11
I.2.10 Modes d'application des huiles essentielles	11

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETALE	12
II.1.1 Récolte	12
II.1.2 Séchage la plante	12
II.1.3 Extraction	13
II.1.3.1 Méthode d'extraction des huiles essentielles	13
- <i>Distillation</i>	13
- <i>Hydrodistillation</i>	13
- <i>Distillation par vapeur d'eau</i>	14
- <i>Distillation par vapeur d'eau directe</i>	14
- <i>Par solvant organique</i>	14
- <i>Par solvant volatil</i>	14
- <i>Par solvant fixe</i>	14
II.1.3.2 Extraction des huiles essentielles de la <i>Melissa Officinalis</i>	14
- <i>Principe</i>	14
- <i>Mode opératoire</i>	15
II.1.4 Calcul du rendement	15
II.2 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	16
II.2.1 Matériels et produits utilisés	16

II.2.2 Méthode de diffusion sur milieux gélosé antibiogramme (méthode des disques)	16
II.2.2.1 Milieu de culture	17
II.2.2.2 Inoculum	17
II.2.2.3 Ensemencement	17
II.2.3 Lecture des résultats	17
II.2.4 Souches testées	18
II.2.5 Méthode de dilution	19
II.3 METHODES D'IDENTIFICATION STRUCTURELLES	20
II.3.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-Visible)	20
- <i>Application de l'UV-Visible</i>	21
II.3.2 Spectrométrie infrarouge (IR)	21
- <i>Application de l'infrarouge</i>	21

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Calcul du rendement	22
- <i>Caractères organoleptiques de l'huile essentielle</i>	22
III.2 Pouvoir antibactérien	23
III.3 Méthodes d'identification structurelle	26
III.3.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-VISIBLE)	26
III.3.2 Spectrométrie infrarouge (IR)	27
 <u>CONCLUSION GENERALE</u>	 <u>29</u>

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont une source importante pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque leurs constituants sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse des médicaments.

Les infections microbiennes quant à elles, demeurent des affections graves et leur fréquence nécessite d'augmenter. Par ailleurs, l'usage extensif des antibiotiques dans la médication humaine et dans l'élevage des animaux a conduit à la sélection des souches microbiennes résistantes. Ce phénomène de résistance des bactéries aux antibiotiques se développe de plus en plus de manière quasi universelle, et il est devenu donc primordial d'orienter les recherches vers des agents thérapeutiques efficaces et avec le moins d'effets secondaires possible.

Cependant, les extraits issus des végétaux commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de multiples études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses.

On a déduit aussi d'après des travaux de recherche que certaines plantes ont des effets antibactériens, antifongiques et mêmes antiviraux assez puissants. Parmi ces plantes, on trouve la Mélisse qui est consommée par l'homme depuis l'ancien temps, en infusion comme extrait liquide, pour ses formidables vertus relaxants et antioxydants...etc.

En Algérie cette plante est un peu ignorée due à une négligence par la communauté scientifique. Le but de notre travail est de dévoiler les secrets d'une mystérieuse plante surtout ses effets antimicrobiens.

A la lumière, l'objectif de ce travail est l'extraction des huiles essentielles de *Mélissa officinalis* de la région de Maadid- M'sila- Algérie, ainsi que l'évaluation de son pouvoir antibactérien.

Le présent manuscrit résume les différents travaux ainsi que les résultats obtenus. Il sera subdivisé en trois principaux chapitres, dont :

Le premier chapitre sera un rappel bibliographique sur la *Mélissa officinalis*, les huiles essentielles et le pouvoir antibactérien. Le deuxième chapitre regroupe les différents matériels et les méthodes expérimentales réalisés au cours de ce travail. Enfin, le troisième chapitre présente les différents résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Chapitre I : GENERALITEES ET DEFINITIONS

I.1 MONOGRAPHIE DE LA PLANTE ETUDIEE

I.1.1 La famille Lamiaceae

La famille Lamiaceae (Labiées) du Latin (Labia) c-a-d lèvre, signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres [1,2], c'est une grande famille comprenant 3200 à 4000 espèces réparties en 200 à 220 genres. Parmi les plus connues, on peut citer la menthe, le thym, le romarin, la lavande, l'ortie

Les Lamiaceae sont très importantes dans la flore algérienne, mais certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces [3]. Ils possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles, dont on note le caractère aromatique des plantes de cette famille [4].

I.1.2 Caractéristiques de la *Mélissa Officinalis*

a- Définition

Très recherchée par les abeilles, le nom de la *Mélissa Officinalis* vient du grec *Mélistophulon* qui signifie « feuille à abeilles ». Elle est plus communément appelée citronnelle ou mélisse-citronnelle, bien que la véritable citronnelle (*Cymbopogon nardus*) soit une graminée asiatique. Les anglais la nomment lemon-balm et les allemands Zitronenmelisse ou Melissenkraut.

C'est une plante médicinale et aromatique [5]. Elle est également une plante herbacée vivace de la famille des *Lamiacées*, très répandue en Algérie [6], avec des feuilles à l'odeur et la saveur citronnées [5] (Figure I.1).



Figure I.1 : *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

b- Description morphologique

La *Mélissa Officinalis* est une plante vivace herbacée de 30 à 80 cm de hauteur, à port de menthe, à feuilles vert vif d'odeur citronnée [7,10].

La partie souterraine est constituée des tiges souterraines, rameuses, portant des racines et produisant des bourgeons adventifs qui permettent la plante de se perpétuer et multiplier.

- **La tige** : Elle est dressée, quadrangulaire (caractère typique des Lamiaceae), plus ou moins velue ; peu ramifiée à la base, elle le devient fortement dans les parties hautes à la floraison. Les rameaux de la partie supérieure portent des fleurs et sont bien développés, tandis qu'ils sont courts et non fleuris dans la partie inférieure (**Figure I.2**).



Figure I.2 : La tige de *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

- **La feuille** : Les feuilles de *Melissa officinalis* sont simples, opposées, ovales, quelque fois légèrement cordiformes, pétiolées, largement dentées en scie, à nervation réticulée et mesurant de 5 à 8 cm sur 4 à 5 cm. La face supérieure, de couleur verte vif foncée, est rugueuse au toucher car elle est couverte en poils tecteurs fins et courts de couleur blanche. Les nervures, saillantes sur la face inférieure beaucoup plus pâle et glabre, forment un réseau entre les branches duquel le limbe est soulevé ce qui donne à la face inférieure un aspect gaufré caractéristique. Les feuilles des rameaux axillaires sont plus petites [7,10] (**figure I.3**).



Figure I.3 : La feuille de *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

- **La fleur** : La floraison a lieu du juin au septembre. Le type d'inflorescence est la cyme ; blanches, rosées, brièvement pédonculées. Les fleurs sont groupées par trois ou six en verticilles axillaires unilatéraux, espacés le long de la tige et insérés à l'aisselle des feuilles supérieures et centrales [7,10] (Figure I.4).



Figure I.4 : La fleur de *Mélissa Officinalis* (Originale, 2019).

I.1.3 Position systématique :

La situation botanique de l'espèce *Mélisse Officinalis* est résumée dans le tableau suivant [8].

Tableau I.1 : Classification botanique de Melisse

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Melissa</i>
Espèce	<i>Melisse officinalis.L</i>
Nom vernaculaire	Herbe au citron, Citronnelle, Piment des ruches à miel, <i>migune</i>

I.1.4 Répartition géographique

a- Répartition géographique et habitat

La mélisse est un sous-arbrisseau en touffes, vivace. Elle est spontanée dans les bois, les

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

bords de chemins, le long des haies et de préférence dans les endroits humides et ombragés. C'est aussi une plante cultivée. Comme pour beaucoup d'autres lamiacées, l'aire de dispersion de la mélisse est extrêmement étendue, mais avec une prépondérance pour les régions méditerranéennes. Elle est répandue en Europe méridionale, au Proche-Orient, en Asie occidentale, en Afrique du Nord, très répandue en Algérie et est acclim [6] atée en Amérique du Nord et en Argentine [7,10].

b- Culture et récolte

Après la deuxième année de culture, on peut obtenir la première récolte normale [9]. Durant la première année, le producteur ne peut avoir que 25 % du rendement normal. On ramasse les feuilles et les tiges avant la floraison c'est-à-dire fin juin à début juillet. Une deuxième récolte peut se faire fin août à début septembre. Autrefois, le ramassage se faisait à la faucille mais aujourd'hui on utilise des récolteuses mécaniques, surtout lorsque la surface de récolte est grande. Le séchage de la plante se fait directement après la fin de la cueillette.

I.1.5 Usage médicinales et thérapeutique de la *Mélissa Officinalis*

La mélisse est une plante originaire de l'est du bassin méditerranéen (Turquie) et que l'on retrouve sous tous les climats tempérés de la planète. Son utilisation, en tant que plante médicinale, remonte à Théophraste et Hippocrate, dans la Grèce antique. A l'époque, on reconnaissait déjà ses bienfaits pour calmer les personnes anxieuses et apaiser les troubles nerveux. Les Arabes l'ont utilisée comme antispasmodique et les Européens comme digestif, calmant et pour le traitement antiviral [11,12].

a- Utilisation interne

- Traitement des troubles nerveux : stress, anxiété, angoisse, crise de nerfs.
- Effets antispasmodiques : spasmes de l'estomac et du colon.
- Troubles du sommeil : insomnie.
- Problèmes cardiaques : tachycardie.
- Troubles gastriques : excès d'acidité de l'estomac.
- Améliore la circulation sanguine : distension ou contraction des vaisseaux.

b - Utilisation externe

- Lutte contre les infections virales : Herpès labial et génital, zona, névralgies et blessures.
- Relaxation des muscles et des nerfs : muscles et nerfs tendus.

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

c- Contre-indications

En raison de l'absence d'une documentation conséquente sur la question, la prise de mélisse est déconseillée aux enfants ainsi qu'aux femmes enceintes ou à celles qui allaitent. La prise de mélisse peut accentuer les effets de l'alcool sur l'organisme. Il est, de ce fait, déconseillé de consommer de l'alcool pendant un traitement avec des produits à base de mélisse [11,12].

I.1.6 Composition chimique de la mélisse

Les feuilles, les tiges et les fleurs sont les parties utilisées en phytothérapie de la Mélisse. Elle peut contenir : Aldéhydes terpéniques (citral, citronellal), alcools terpéniques (eugénol, géraniol, linalol, citronellol), sesquiterpènes (carophyllène). Les aldéhydes terpéniques ont des propriétés antivirales, calmantes et sédatives [13].

I.2 GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I.2.1 Historique

Les huiles sont des produits naturels existant depuis la haute antiquité, les parfums et les arômes furent les premiers signes aux cérémonies religieuses, en suite elles sont dus aux fêtes profanes et en fin à la toilette [14]. Les essences livrent peu à peu leurs secrets depuis l'avènement de la chimie organique au XIX^{ème} siècle [15]. Au XV^{ème} siècle, PARACELSE, médecin suisse qui est considéré comme le père de la pharmacie chimique, étudie l'extraction de l'âme des végétaux sous forme de quintessence, ou 5^{ème} essence à laquelle on donnera le nom d'esprit puis essence et finalement huile essentielle [16].

I.2.2 Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique [17]. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits, mais également à partir de gommés qui s'écoulent du tronc des arbres [18], et séparées ensuite de la phase aqueuse par des procédés physiques [19].

I.2.3 Localisation

Les HE sont localisés le plus souvent dans des organes sécréteurs. Leurs stockages se font dans les organes végétaux : fleurs, feuilles, fruits, tiges, bois, écorces ou parties souterraines (racines, rhizomes) à proximité de la surface. Bien que toutes les parties d'une plante puissent contenir des essences, leurs compositions chimiques varient d'un organe à un autre, mais la plus importante concentration se trouve au niveau des fleurs et des feuilles [20].

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

I.2.4 Composition et constituant chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes et variables, formés de constituants qui appartiennent à deux groupes de molécules : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques, dérivés du phénylpropane, d'autre part.

- Les terpénoïdes : Les terpénoïdes ou les terpènes ; sont des dérivés de l'isoprène (méthyl-2-butadiènes) ; chaque groupe de terpène est issu de la condensation d'un nombre d'unités isopréniques $n(C_5H_8)$. Selon le nombre n les terpènes sont classés en : monoterpènes (composés en C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}) et tétraterpènes (C_{40}) [44] (Figure I.5).

- Les composés aromatiques : Sont des dérivés de phénylpropane (C_6-C_3) (Figure I.5), ils sont beaucoup moins présents dans la composition de l'huile essentielle [21].

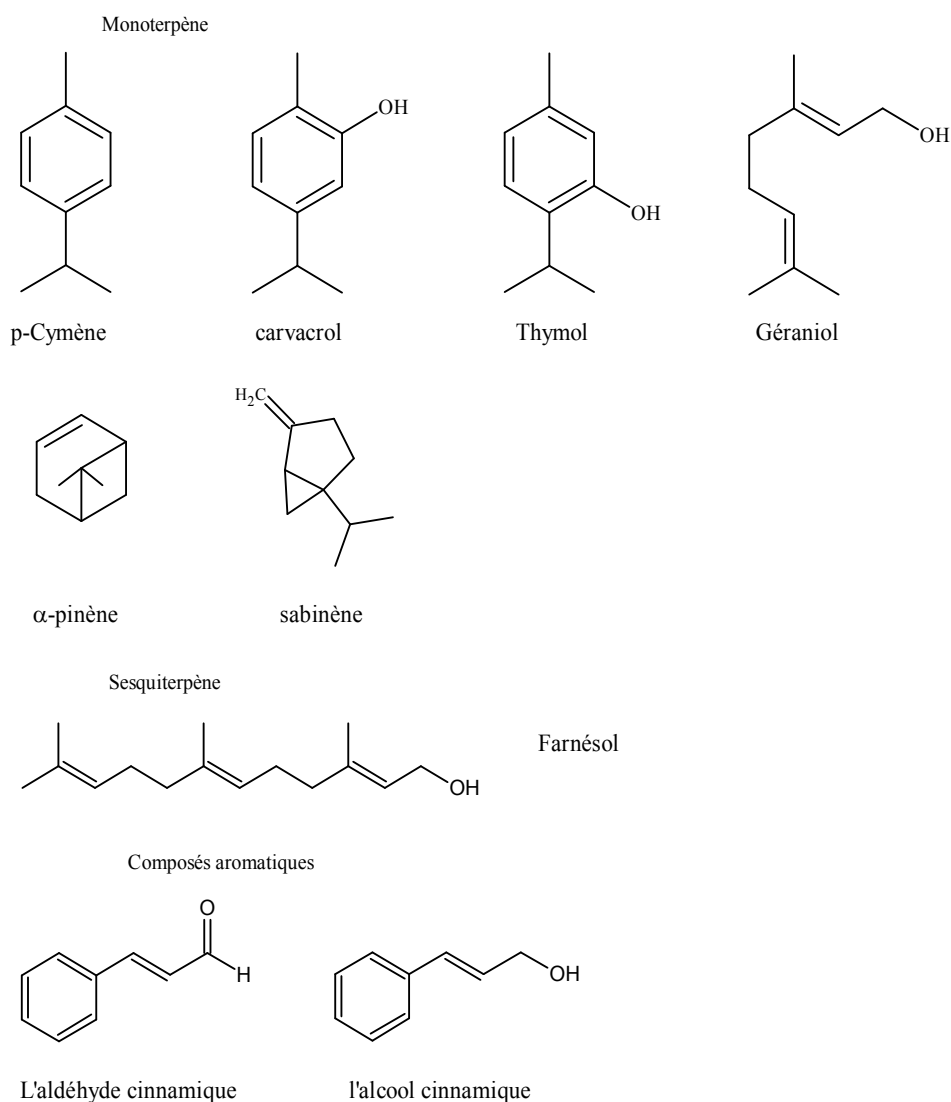


Figure I.5: Classes des constituants chimiques des huiles essentielles [22].

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles [22].

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux HEs leurs propriétés antibactériennes. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont, du fait de caractère acide (hydroxyle), les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, de *Corydothymus capitatus* et de *Syzygium aromaticum*, démontrent les plus hautes activités antibactériennes [22].

I.2.5 Propriétés physico-chimiques et médicinales des huiles essentielles

Les HE sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées ; rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation [23].

Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15). Ce sont des mélanges complexes de constituants variés en concentration variable dans des limites définies [24].

Les huiles essentielles forment donc un groupe homogène du point de vue de leurs propriétés physiques. Par contre, elles sont par leurs constitutions chimiques, le groupe le plus hétérogène qui existe [20, 25]. Beaucoup d'huiles essentielles ont des propriétés médicinales qui ont été utilisées en médecine traditionnelle depuis des temps très anciens et qui sont largement répandues toujours aujourd'hui. Par exemple :

- *L'huile essentielle de clou de girofle* : Analgésique puissant, très utile en art dentaire.
- *L'huile essentielle de lavande officinale* : Employée en aromathérapie comme antiseptique et pour un certain nombre d'usages médicinaux.
- *L'huile essentielle d'arbre à thé* : Antiseptique de large spectre.
- *L'huile essentielle de menthe poivrée* : Utilisée contre les maux de tête.

I.2.6 Conservation des huiles essentielles

Très volatiles par nature, les HE peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques pendant environ trois ans. Pour cela, elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur, et contenues dans des flacons en verre opaques ou teintés hermétiquement clos [20, 25, 26].

I.2.7 Activités biologiques des huiles essentielles

Le rôle physiologique des huiles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites, leur confère des rôles et propriétés biologiques [22].

I.2.7.1 Activité anti-oxydante

Le pouvoir antioxydant des HE est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [27]. Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [27].

I.2.7.2 Activité anti bactérienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par *Delacroix* [28]. Depuis cette période, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes [18]. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques [22].

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre [17, 29]. Ces huiles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques [30]. Leur activité antibactérienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [31]. Dont les facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles sont :

a- Composition chimique

Les composés chimiques connus pour leur efficacité antibactérienne et leur large spectre sont

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures [23].

Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent. Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Cependant, il est à signaler que les phénols seuls ne sont pas responsables de l'intégralité de l'activité des huiles essentielles, les autres composés chimiques doivent également être pris en compte [23], car les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique. D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes [32].

b- Type de bactérie ciblée

Les bactéries n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles [22], néanmoins une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quel que soit l'huile essentielle par rapport à celles vivant en aérobiose [33,34]. Par exemple, *Escherichia coli* est plus sensible vis à vis de l'huile de *Melaleuca alternifolia* que *Staphylococcus aureus* [35].

Toutefois, la sensibilité des bactéries peut varier selon le genre et la souche testée, l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle mis en évidence [36].

c- Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+) : ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram + telle que *Staphylococcus aureus* et à Gram - telle que, *Escherichia coli* [37,38].

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des bactéries comme l'enzyme *ATPase*, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP [39,40]. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée [41].

I.2.8 Identification et séparation des huiles essentielles

La classe d'un composé est toujours connue par sa réponse aux tests de coloration à sa

CHAPITRE I GENERALITEES ET DEFINITIONS

solubilité et par les caractéristiques du spectre ultraviolet. L'identification complète à l'intérieur de la classe dépend de la détermination d'autres propriétés ensuite compléter ces données avec de littérature les propriétés comprennent le point de fusion (pour les solides) le point d'ébullition (pour les liquides) et enfin à la mobilité ou le temps de rétention relative. Cependant, les données informatives dans une substance naturelle sont également ces caractères spectrales Uv-visibles, IR et RMN.

I.2.9 Toxicité des huiles essentielles

Les HE sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie, etc...) principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques). L'ingestion de plus de 10 ml d'huile essentielle par exemple est neurotoxique et épileptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus Encéphalique [23, 24, 42].

I.2.10 Modes d'application des huiles essentielles

On peut utiliser les huiles essentielles en goutte buvables, en gélules, en suppositoires et ovules, en bains mélangées à des huiles végétales ou lait des massages à raison 10 % d'huile essentielle et 90 % huiles végétales.

- *Sur la colonne vertébrale* : Pour apaiser le système nerveux (lavendula officinalis).
- *Sur le thorax* : Pour agir sur les bronches avec des HEs riches en cinéol (Eucalyptus radiata)
- *Pour activer les fonctions corticosurrénales* : Frictionner la région avec des huiles essentielles positivement riches en terpènes (Pinus Sylvestris).
- *Dans le cas d'une infection/inflammation* : Placer les huiles essentielles sur la gorge et la nuque (Bois de Rose).
- *Pour la peau* : C'est l'un des usages, le plus pratique des huiles essentielles. De plus la résorption percutanée des huiles essentielles à lieu très rapidement.
- *Par voie orale* : Quand il ya urgence, on peut les absorber mélangées dans un excipient (huile végétale, Miel) avec une efficacité plus puissante que par voie percutanée [43, 13].

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETALE

La *Mélisse Officinalis* est une plante vivace haute de 30 à 80 cm (parfois elle peut atteindre jusqu'à 1 mètre). Ses tiges sont dressées et divisées en plusieurs tiges secondaires dites « rameuses. Les feuilles grandes et ovales.



Figure II.1 : La *Melissa officinalis* (Originale, 2019).

II.1.1 Récolte

L'étude phytochimique a été réalisée sur les parties aériennes (les feuilles, tiges). *Melissa officinalis* a été récoltée de la région de M'aadid 35 Km de la wilaya de M'sila durant le mois de Mai 2019 (Figure II.2).

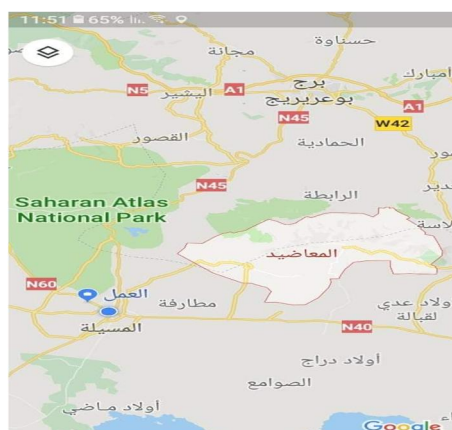


Figure II.2 : Google map au niveau de région de lawilaya de M'sila (Maadid).

II.1.2 Séchage la plante

Le séchage permet d'éliminer la quantité d'eau retenue dans la plante. C'est une opération importante qui doit être faite avant toute utilisation. Le séchage a été effectué à l'ombre et à l'abri de la lumière (Figure II.3 et II.4)



Figure II.3 : Plant fraîche



Figure II.4 : Séchage de la plante (Originale, 2019)

II.1.3 Extraction

Les techniques d'extraction des huiles essentielles les plus employées sont : la distillation et l'extraction par les solvants organiques.

II.1.3.1 Méthode d'extraction des huiles essentielles par distillation

Le mode précis de l'extraction, dépend de la texture de l'échantillon végétale à extraire, sa teneur en eau et le type de substances à isoler. Cependant, plusieurs techniques de distillation sont utilisées pour extraire les huiles essentielles à partir des plantes aromatiques [44]. Ce procédé risque de provoquer la modification de l'essence, due à la chaleur, la distillation se subdivise en hydrodistillation, distillation à vapeur d'eau et distillation par vapeur directe.

- *Hydrodistillation*

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est en suite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse par différence de densité [44].

Proposée par Grenier, 1891, l'hydrodistillation est la méthode, la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, ce procédé permet non seulement d'isoler les huiles essentielles à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements [45,46]. Cette méthode est surtout applicable dans le cas où l'échantillon résiste à une température d'ébullition, son taux d'huile essentielle est élevé [44].

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

- Distillation par vapeur d'eau

C'est la méthode la plus employée pour récupérer les huiles essentielles, dont 80% d'entre elles sont récupérées. La distillation s'effectue, en faisant passer à travers le matériel végétal un courant de vapeur d'eau qui entraîne l'huile essentielle.

- Distillation par vapeur d'eau directe

C'est la technique la plus récente, le matériel à distiller est déposé sur grille de façon que la vapeur puisse la saturer et extraire l'huile essentielle qui sera véhiculée vers le réfrigérant pour être condensée [44].

- Par solvant organique

Certaines huiles essentielles ont une densité proche de celle de l'eau et le procédé de distillation ne peut être utilisé. D'où la nécessité de recourir à une extraction par solvant organique malgré leur faible pourcentage d'utilisation.

-Par solvant volatil

L'extraction par solvant volatil consiste à la mise en contact de la matière végétale, avec un solvant qui dissout et extrait les constituants solubles contenus dans la plante. L'opération peut être renouvelée plusieurs fois sur la même charge de matière végétale. Actuellement les solvants les plus utilisés dans l'industrie sont : l'hexane, l'alcool, l'éthyle et l'eau.

- Par solvant fixe

Cette méthode est appelée aussi extraction par épuisement moyen de corps gras. La solubilité des essences végétales dans les corps gras est un phénomène observé depuis longtemps et dans l'antiquité. On connaissait des huiles essentielles parfumées par infusion de fleurs notamment des roses dans une huile végétale [47.]

II.1.3.2 Extraction des huiles essentielles de la *Melissa Officinalis*

L'extraction d'huile essentielle est réalisée au niveau de laboratoire de chimie N°2 du département de chimie de la faculté des sciences de l'université de M'sila ; l'appareil d'extraction des H.E type Clevenger.

- Principe

L'hydrodistillation (water distillation) est la méthode la plus simple et de ce fait, la plus anciennement utilisée [48 ,49] Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon, un

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient [44].

- Mode opératoire

L'extraction des HEs de la plante *Mélisse officinalis* a été effectuée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été rincé avec de l'eau distillée (mis à blanc) afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil pour éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction (**Figure II.5**), [22].

Cette méthode consiste à introduire 40 g de matériel végétal dans un ballon de 1 l contenant 450 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 1h 30min à l'aide d'un chauffe-ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité[48,49] .

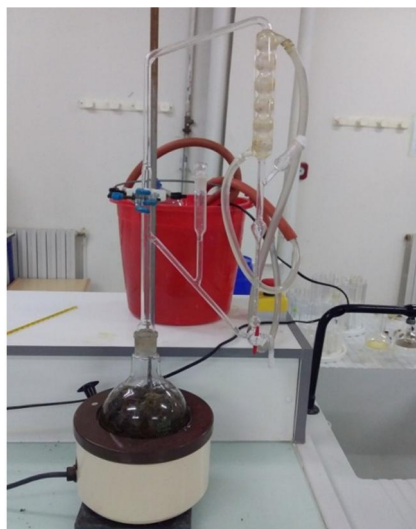


Figure II.5 : Dispositif d'Extraction par hydrodistillation type Clevenger (Originale, 2019).

Après extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un eppendorf stérile. L'eppendorf a été couvert d'un papier aluminium à l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques

II.1.4 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (mHE) et la matière végétale utilisée (m), (Benb. II

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

est donné par la formule suivante [20] :

$$\text{RHE (\%)} = (\text{mHE} / \text{m}) \cdot 100$$

- RHE : Rendement de l'huile essentielle en *Melissa officinalis* (%).
- mHE : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).
- m : Masse en gramme de la matière végétale sèche (g).

II.2 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du laboratoire central des analyses de l'hôpital * EZZAHRAOUI * de M'sila sur les souches bactériennes.

II.2.1 Matériels et produits utilisés

- Les gants.
- Becque de BENZEN
- Les tubes.
- Portoire des tubes.
- L'huile essentielle de la plante
- Boîte de pétri
- Pipette pasteur ou micropipette
- Souches à tester en bactérie.
- Les Antibiotiques
- L'étuve (37°)
- L'eau physiologique
- Disque stérile de papier Wattman
- Ecouvillon stérile
- Milieu Gélose Mueller Hinton (pour la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et l'huile essentielle).
- Diméthyle sulfoxyde (DMSO).

II.2.2 Méthode de diffusion sur milieux gélosé antibiogramme (méthode des disques)

La technique des disques de diffusion est simple à mettre en œuvre. Elle fournit seulement les informations qualitatives et semi qualitatives sur la sensibilité d'un microorganisme à un antibiotique donné [51]. La réalisation de cette méthode repose sur le principe d'antibiogramme). Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre, contenant 10 µl

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

d'extraits à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé approprié pour chaque souche, préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 20 min avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h [51].

II.2.2.1 Milieu de culture

La gélose Milieu de Muller-Hinton est versée dans les boîtes de pétri a une épaisseur de 3 mm, ces géloses sont pré séchées avant l'emploi.

II.2.2.2 Inoculum

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement racler quelque colonie bien isolée et parfaitement identique, on décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

II.2.2.3 Ensemencement

On fait placer 6 disques sur chaque boîte pétri (une contienne les souches testées). Par une micropipette on injecte sur chaque disque une concentration différente (C₀, C₁, C₂, C₃ et C₄) et le DMSO comme témoin, enfin on incube dans une étuve pendat 24 heures à 37°C.

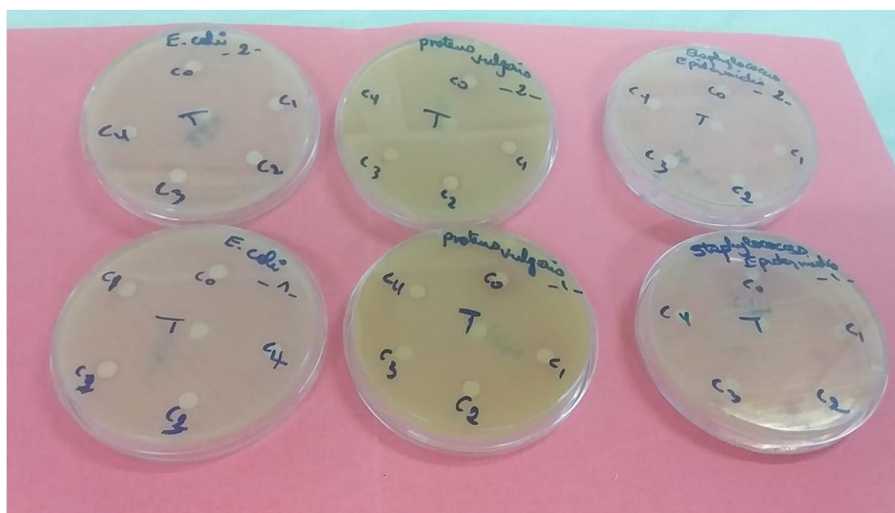


Figure II.6 : L'activité anti- bactérienne de HE de Melissa officinalis (Originale, 2019).

II.2.3 Lecture des résultats

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. L'importance des diamètres des zones reflète l'impact de l'huile essentielle sur les souches

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

testées [49,53]. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [23] **Figure II.8** :

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

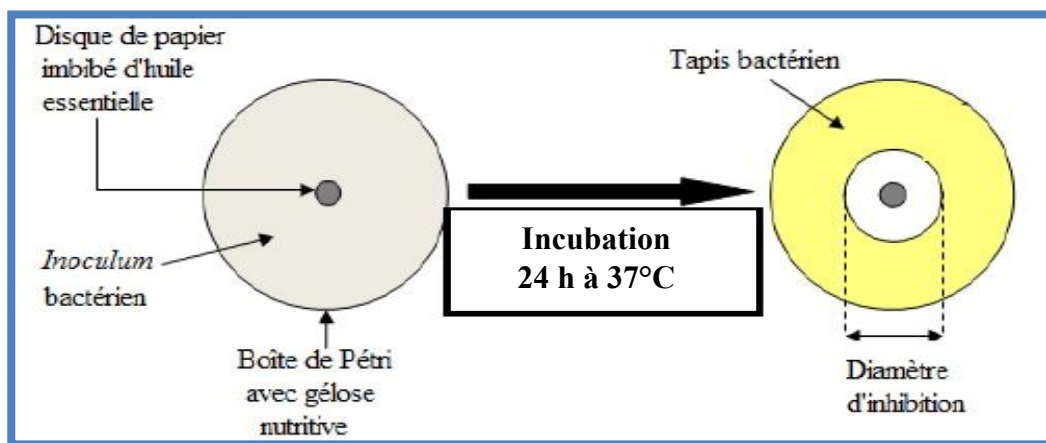


Figure II.7 : Principe de la méthode de diffusion par disque [64].

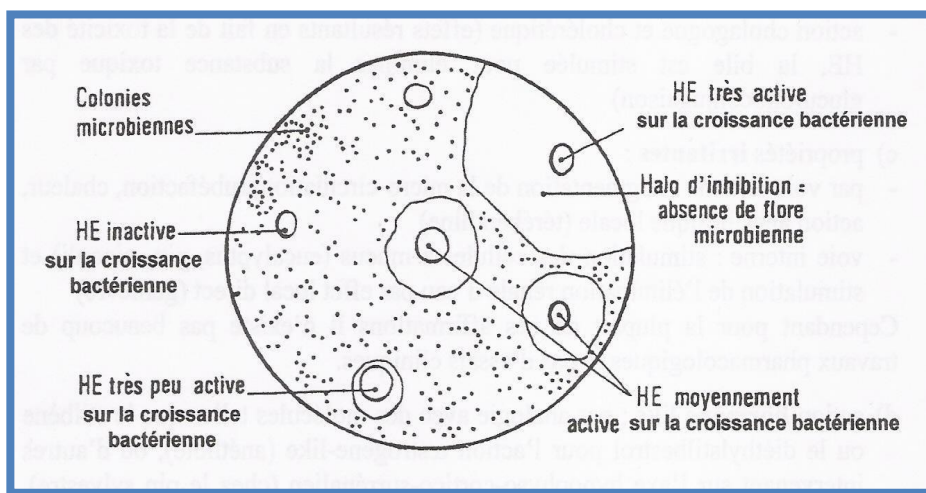


Figure II.8 : Exemple pour la lecture de l'aromatogramme [24].

II.2.4 Souches testées

Les souches bactériennes de référence proviennent du laboratoire de microbiologie à l'université M'sila il s'agit des espèces suivantes :

- *Escherichia coli* : les bacilles à Gram - est un hôte normal de la flore digestive de l'homme

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

et de nombreuses espèces animales, fréquemment responsables des infections de l'arbre urinaire et de la vésicule biliaire, [55] et généralement sensibles aux antibiotiques, comme les amino- pénicillines, céphalosporines, Quinolone [56, 57] .

- *Staphylococcus aureus* : (Gram+) les S. aureus sont en réalité des intoxications dues à l'ingestion d'aliments. Chez l'homme S .aureus est responsable de pathologies très diverses du point de vue clinique comme les infections de la peau et des muqueuses. Elle est sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques parmi lesquelles ; Céphalosporines, oscacillines [51].

- *Proteus vulgaris* : est une espèce du bacille Gram-, compensable du tube digestif de l'homme et des animaux. on peut le trouver dans le sol, l'eau, et les matières fécales.

- *Levure Candida albicans* : est l'espèce de levure la plus importante et plus connue du genre candida. Est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain.

Tableau II.1 : Liste des souches microbiennes testées.

La souche	ATCC	Famille	Gram
<i>Escherichia coli</i>	Clinique	Enterobacteriaceae	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clinique	Micrococcaceae	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Clinique	Enterobacteriaceae	-
<i>levure candida</i>	Clinique		

II.2.5 Méthode de dilution

Cette méthode est basée sur la dilution de l'huile essentielle à des différentes concentrations, testés, par DMSO. Les concentrations utilisées sont préparées selon le protocole suivant :

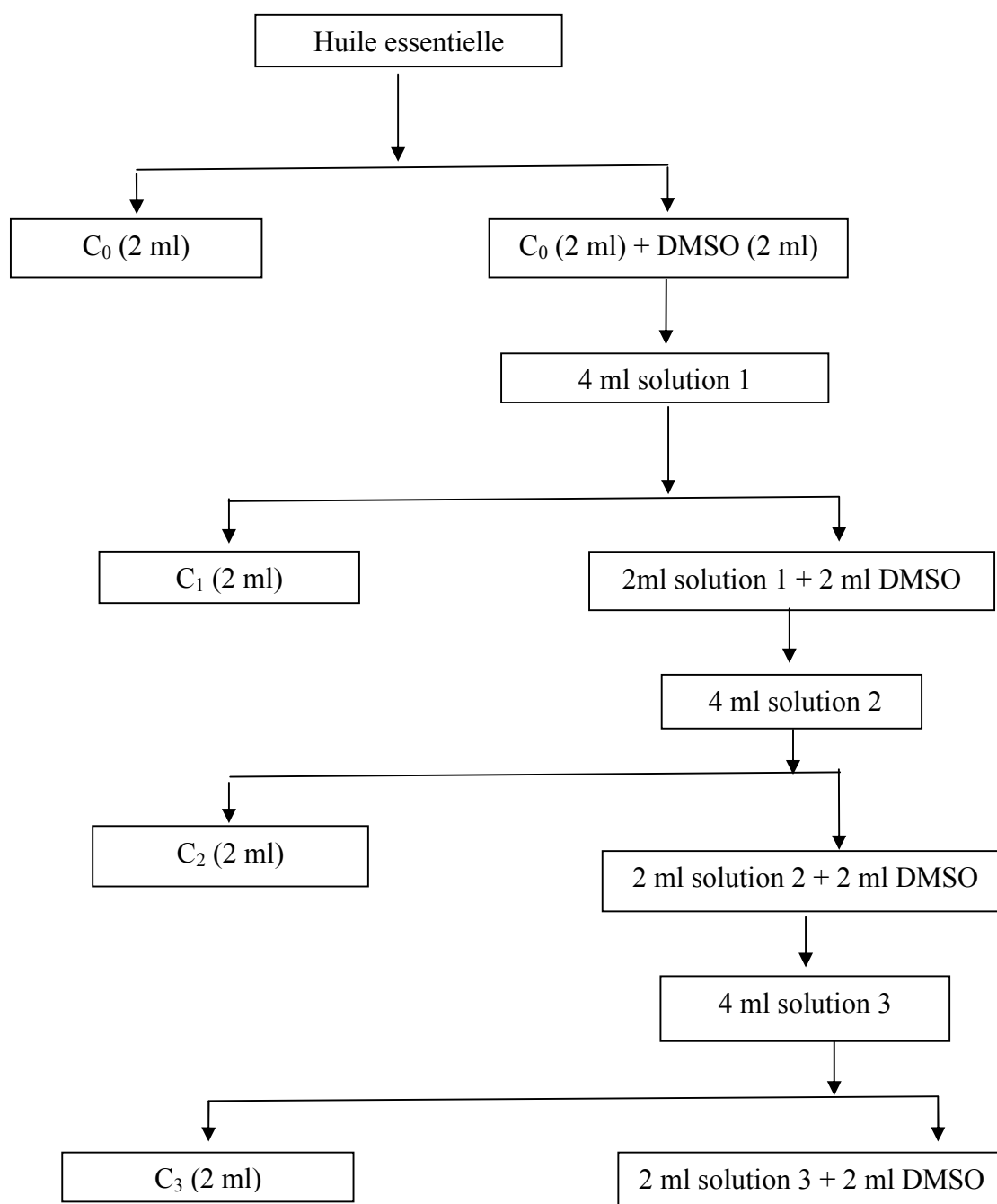


Figure II.9 : Protocole de dilution de l'huile *Melissa officinalis*.

II.3 METHODES D'IDENTIFICATION STRUCTURELLES

II.3.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-Visible)

Ces mesures spectrales sont importantes dans l'identification de plusieurs constituants de l'huile. Dans cette technique on utilise des solutions de la plante très diluées contre un blanc qui est le solvant, le solvant le plus utilisé en ultraviolet, est l'éthanol à 15% dont la plus part

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

des composés sont très solubles, les composés incolores absorbent dans une région de spectre variant entre 200 et 400 nm, alors que ceux colorés présentent une région d'absorption comprise entre 200 et 700 nm [51].

L'absence complète d'absorption dans l'ultraviolet explique une information utile dans la structure et indique la présence des lipides saturés ou d'alcane dans les fractions lipidiques, des amino-acides aliphatiques ou sucres dans les fractions solubles dans l'eau.

- Application de l'UV-Visible

- Détermination de concentrations inconnues.
- Détermination de la masse moléculaire.
- Recherche de la structure.
- Identification d'un chromophore à l'aide de spectre de comparaison [61].

II.3.2 Spectrométrie infrarouge (IR)

L'identification des substances d'une plante par spectrométrie infrarouge est effectuée soit par enregistrement automatique du spectrophotométrie IR, soit par une solution de chloroforme ou tétrachlorure de carbone (1,5 %). Les régions du spectre IR supérieur à 1200/cm, montrent des pics étant dus aux vibrations de liaisons individuelles ou groupements fonctionnels de la molécule, dans les régions du spectre IR inférieur à 1200/cm les bandes résultantes indiquent la vibration de la molécule entière.

Le spectre IR est largement utilisé dans l'identification des constituants des huiles essentielles et surtout, après leur séparation par la technique de CPG [62].

- Application de l'infrarouge

Les spectroscopies IR permettent d'effectuer les déterminations suivantes :

- Identification des groupements fonctionnels.
- Teste d'identité.
- Contrôle de réaction de synthèse et détermination de la structure [63].

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Calcul du rendement

Le rendement d'extraction, exprimé en pourcentage, a été déterminé par la formule indiquée dans le chapitre Matériels et méthode dont : $m_{MHE} = 0,95 \pm 0,05g$ et $m = 40g$

Le rendement moyen d'extraction des H.E obtenu est de :

$$R_M \% = 2,37 \pm 0,13 \%$$

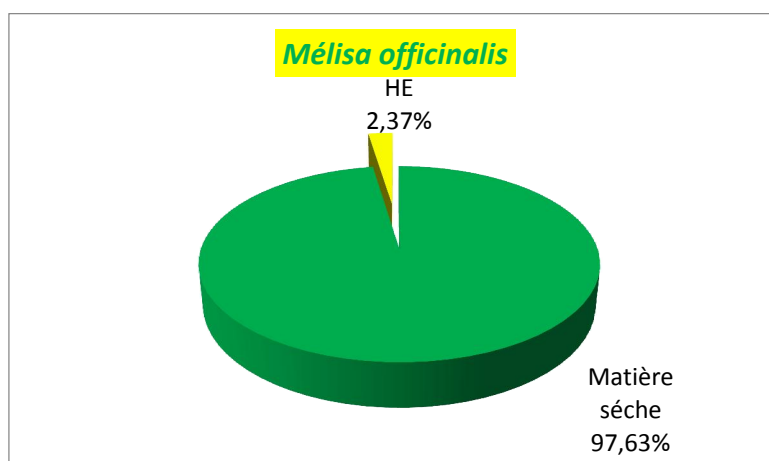


Figure III.1 : Teneur en HE de la partie aérienne de la *Mélissa officinalis*.

Tenant compte de la récolte fraîche (plante jeune) *Mélissa officinalis*, on peut constater que notre plante est fortement très riche en H.E ($R = 2.37\%$). A noter que les travaux effectués par Belgoundouz et al (ref) ont montré une faible teneur en HE de la *Mélissa officinalis* (de l'ordre de 0,26 %), de la région de hammam melouane de Blida.

En effet, les teneurs en H.E varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres d'extraction : solide-liquide, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant. Il a été démontré aussi, que l'extraction à températures élevées permettait d'obtenir des rendements plus élevés que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante.

Cette richesse peut être aussi expliquée par la méthode choisie (hydrodistillation par Clevenger), ainsi que les paramètres climatiques de la région de la récolte.

- Caractères organoleptiques de l'huile essentielle

L'huile essentielle préparée, présente les caractères organoleptiques suivants : Aspect : liquide, Couleur : jaune clair, odeur : Aromatique et Type : volatil (Figure III.2)



Figure III.2 : Huile essentielle de la *Mélissa Officinalis*.

III.2 Pouvoir antibactérien

Pour l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'HE préparé, nous avons utilisé la technique des disques de diffusion, qui est une méthode simple à mettre en œuvre comme elle fournit seulement les informations qualitatives et semi qualitatives sur la sensibilité d'un microorganisme donné à un antibiotique donné, la réalisation de cette méthode repose sur le principe de l'antibiogramme [52].

Les figures III.3 et III.4 ; montrent l'antibiogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'antibiotique GN10 et l'HE à différentes concentrations, sur les souches *E.Coli* et *proteus vulgaris* respectivement.

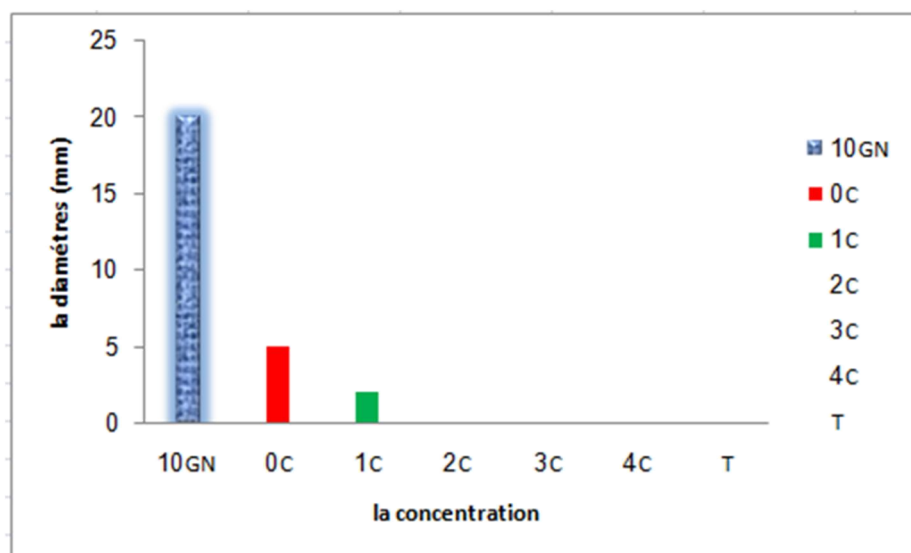


FIGURE III.3 : Diamètres des zones d'inhibition d'E.Col / l'antibiotique (GN10) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

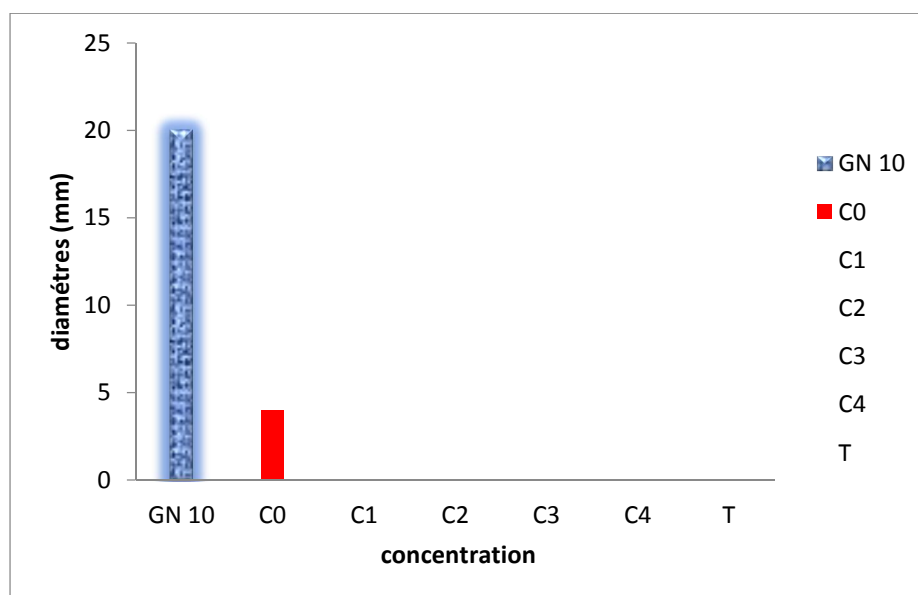


Figure III.4 : Diamètres des zones d'inhibition proteus vulgaris / l'antibiotique (GN10) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

L'observation de ces résultats nous permettons de constater que :

- L'*E. Col* et *proteus vulgaris* sont très sensibles à l'ATB GN10 ($\phi = 20\text{mm}$).
- L'HE ne donne aucune zone d'inhibition vis-à-vis la *proteus vulgaris*.
- L'*E. Col* et *proteus vulgaris* sont résistantes à l'HE de la Mélisse à des différentes concentrations.

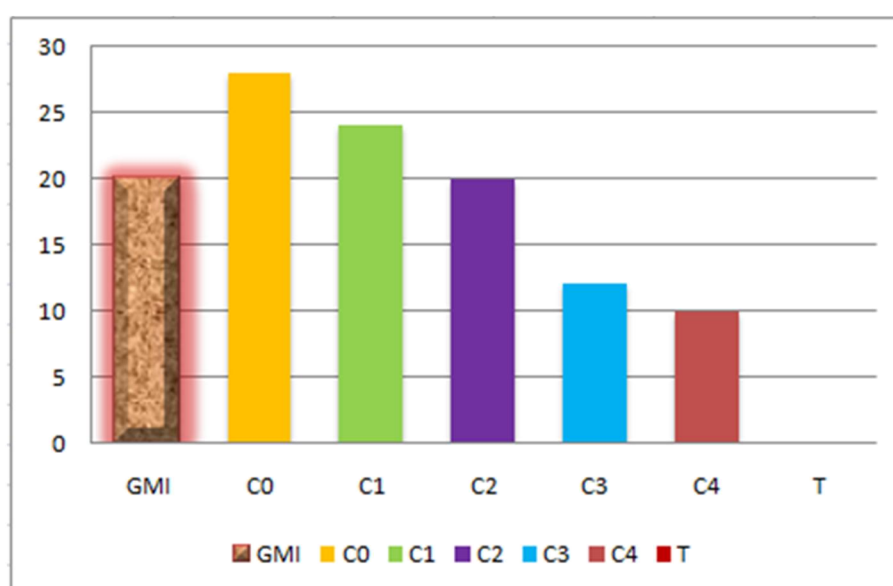


Figure III.5 : Diamètres des zones d'inhibition de Staph. / L'antibiotique (GMI 15) et les différentes concentrations de l'HE de la Mélisse.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure III.5 présente l'antibiogramme de l'effet de l'antibiotique GMI 15 et l'HE à différentes concentrations sur la souche *Staph*. Les différents résultats obtenus nous laisse conclure que :

- Le *Staph* est très sensible à l'ATB (GMI 15) ($\phi = 20\text{mm}$) et très à extrêmement sensible à l'HE aux concentrations : C_0 , C_1 et C_2 ($\phi \geq 20\text{mm}$).
- A des concentrations diluées en HE (C_3 , C_4), La souche *staphylococcus aureus* s'avère sensible. ($\phi = 10$ à 12 mm) (Figure III.6).



Figure III .5 : Zones d'inhibition de l'antibiotique (GMI 15) (à droite), et l'HE à différentes concentration (à gauche) sur la *staphylococcus aureus*.

Il a été montré que l'huile essentielle de la mélisse présente un effet très considérable vis-à-vis l'inhibition de la croissance des levures, à savoir ; les *aspergillisses* ainsi que les différentes espèces du *candida*.

Pour cela, nous avons procédé à l'étude de l'effet des différentes concentrations de l'HE de *Mélissa officianilis*, sur la levure *candida albican*.

L'antibiogramme de la figure III.6 et la figure III. 7, résumant l'effet des différentes concentrations de l'HE de *Mélissa officianilis*, sur la levure *candida albicans*. L'observation de ces résultats nous permettent de constater que :

- Les concentrations C_0 et C_1 en huile essentielle de la *Mélissa officianilis*, ont exercés un effet inhibiteur extrêmement très fort, avec des diamètres de l'ordre de : 30 et 20 mm, respectivement.
- La concentration C_3 en huile essentielle de la *Mélissa officianilis*, exerce, à son tour, un effet inhibiteur considérable, avec un diamètre de l'ordre de 10 mm.

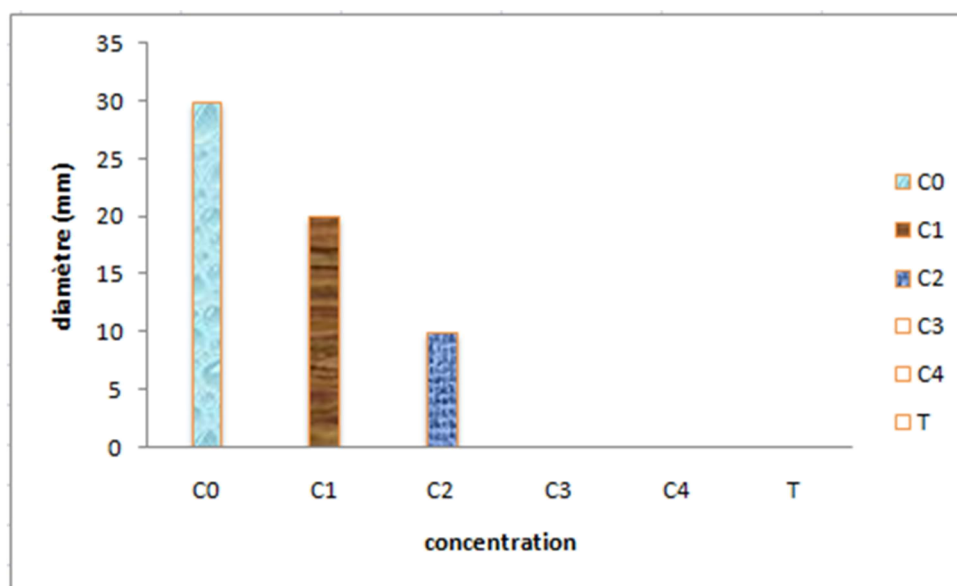


Figure III.6 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes concentrations de HE de la Mélisse, sur la levure *Candida albicans*.



Figure III.7 : Zones d'inhibition des différentes Concentrations en HE de la Mélisse sur la levure *candida albicans*.

III.3 Méthodes d'identification structurale

III.3.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-VISIBLE)

Le spectre d'absorption enregistré dans le domaine ultraviolet-visible (200-800 nm), de l'huile essentielle de la *Melissa officinalis*, dilué dans le DMSO, montre l'apparition d'un pic d'absorption aux alentours de 271 nm, avec un très faible épaulement autour de 320 nm (figure III.8).

Comme on constate aussi, l'absence complète d'absorption dans la région du visible (400-800 nm), ceci peut être expliqué par la présence des composés incolores (transparents), dans la composition de l'HE (caractère organoleptique de l'HE).

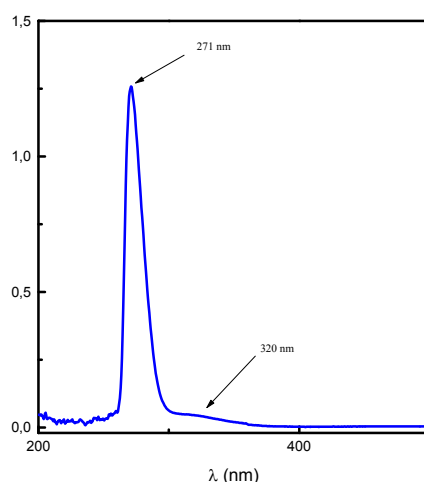


Figure III.9 : Spectre ultraviolet-visible d'huile essentiel *Melissa officinalis*.

La présence d'une absorption dans l'ultraviolet explique une information utile dans la structure des différents composants de l'HE, et indique peut être l'absence des lipides saturés, d'alcane, des amino-acides aliphatiques ou sucres dans les fractions solubles dans le DMSO.

En effet, le pic situé à 271 nm peut être attribué aux transitions $\pi-\pi^*$ (les électrons des liaisons insaturées). Cependant, l'épaulement aux allants tours de 320 nm peut être dû aux transitions $n-\pi^*$, des électrons des doublets non liants (la possibilité de présence des composés oxygénés).

III.3.2 Spectrométrie infrarouge (IR)

Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) représente les pics moléculaires d'absorption et de transmission qui correspondent à la fréquence des vibrations entre les atomes de différentes liaisons existantes, sous radiations IR.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux aromatiques très complexes et très concentrés. Elles peuvent contenir plus d'une centaine de molécules aromatiques, en mélange, avec des proportions très variables. Mais dans la plus part du temps, l'huile essentiel peut contenir un, deux ou trois composés majoritaires, qui sont généralement les responsables de leur odeur caractéristique.

La figure III.10, représente le spectre IR de l'HE de la *Melissa officinalis*, dilué dans le DMSO, sur des pastilles en KBr, enregistré entre 400-4000 cm^{-1} .

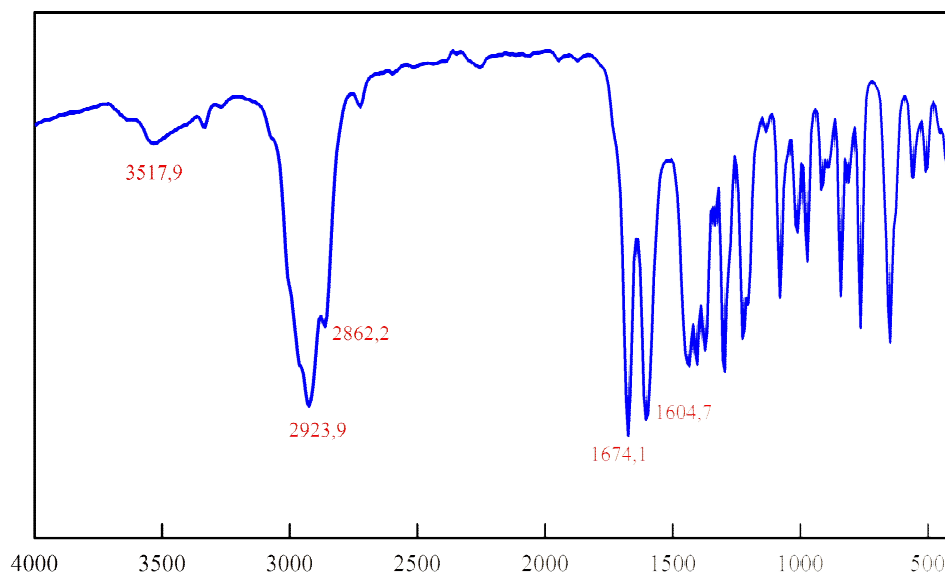


Figure III.10: Spectre infrarouge d'huile essentielle

L'observation du spectre IR de l'huile de *Melissa officinalis*, nous a permis d'une part de remarquer la clarté de ce spectre, qui peut être dû à la présence d'un ou deux composés majoritaires.

D'autre part d'attribuer les différents bandes d'absorption aux :

- $3517,9 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement - OH (vibration d'élongation)
- $2923,9 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement $\text{CH}_3\text{-CH}$ (vibration d'élongation)
- $2854,5 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ (vibration d'élongation)
- $1674,1 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement C=C (vibration d'élongation)
- $1604,7 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au groupement C=C d'autre environnement (vibration de déformation).

CONCLUSION

Depuis des siècles, la Mélisse est traditionnellement utilisée pour ses propriétés sédatives. Des études sont menées depuis des dizaines d'années afin d'établir si les propriétés de cette plante peuvent être développées scientifiquement. Il est donc désormais admis que de nombreux systèmes sont impliqués dans cette activité. La composition chimique de *Melissa officinalis* est très riche, et un nombre important de ses constituants ont été étudiés indépendamment dans le but de déterminer celui ou ceux qui seraient à l'origine de l'action pharmacologique.

A cet effet l'objectif de notre travail consiste à l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de La Mélisse (*Melissa Officinalis*).

L'huile préparée par hydrodistillation manifeste un rendement de l'ordre de 2,37 % de la matière végétale. Une valeur qui confirme la richesse de la *Melissa Officinalise* en huile volatile.

Cependant, le suivi de l'effet antibactérien de l'HE par la méthode des disques, nous a permis de conclure, d'une part ; une résistance remarquable de l'*E.Col* à l'HE. D'autre part, Le *Staph* s'avère extrêmement sensible à l'HE avec des concentrations élevées (C_0 et C_1), et plus ou moins sensible à des faibles concentrations (C_2 et C_3).

A noter que, L'HE de la mélisse a exercé un effet nucléaire sur la levure *candida albicans*, avec une zone d'inhibition de diamètre de 30 mm.

Enfin, notre objectif était pratiquement atteint, mais il est loin d'être terminé. Il sera nécessaire d'être suivi par de nombreuses perspectives, dont :

- Rechercher les différents constituants bioactifs et responsables des effets biologiques.
- Essayer l'HE sur des patients qui atteignent des infections d'origine des levures.
- Rechercher d'autres effets biologiques à savoir le pouvoir antifongique et antiviral.
- Préparer des formulations médicales (l'HE utilisée en tant qu'un principe actif) en raison de les appliquer en mode *in-vivo*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Couplan F., (2000). Dictionnaire étymologie de botanique. Nestlé (Ed). Luisane. Paris.
- [2] Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S., Ghorbani A., (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology, *Iran, J. Pharm. Res.* 2:63-79.
- [3] Hammoudi R., (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Thèse de doctorat ès sciences, biologie, Université Kasdi Merbah – Ouargla, 5 ; 23 ; 62 ; 63p.
- [4] Zeghib A., (2013). Etude photochimique et activités antioxydantes, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*. Thèse de doctorat en sciences, chimie organique, Université de Constantine 1, 2-10 p.
- [5] Kothe HW., (2007). 1000 Plantes aromatiques et médicinales. Terres Editions. ISBN : 978-2-35530-pp3-5.
- [6] Site d'internet Scientific Bouguendous Rachida.
- [7] Bartels A., Guide des plantes du bassin méditerranéen, Editions Eugen Ulm.er, 1986.
- [8] Quezel P., Santa S., 1962/1963 –Nouvelle de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1 -2. Paris, C,N,R,S .1170p.
- [9] Site d'internet Scientific www.tela-botanica.org.
- [10] Bruneton J., Pharmacognosie Phytochimie et Plantes Médicinales, 3ème éd., Paris, 1999.
- [11] European Scientific Cooperative on Phytotherapy (Ed). *Melissea folium*, ESCOP Monographs on the Medicinal Uses of Plants Drugs, Centre for Complementary Health Studies, Université d'Exeter 1996.
- [12] Blumenthal M., Goldberg A., Brickman J (Ed). Expanded Commission E Monographs, *American Botanical Council and Integrative Medicine Communications* 2000.
- [13] Franchomme P. et Pénéol D., L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois Éditeur 1990 Pizzorno JE Jr, Murray Michael T (Ed). *Textbook of Natural Medicine*, Churchill Livingstone 2006; Organisation mondiale de la santé. WHO monographs on selected medicinal plants, vol. 2, Suisse, 2002.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [14] Delagner R., (1930). Les essences naturelles et parfum. Ed. Armond, Colin. Paris.
- [15] Valnet J., (1980). Traitement des maladies par les essences des plantes .éd Maloin. Paris
- [16] Durrafour S., (1981).Traitement des maladies par les essences des plantes. Ed. Maloine. Paris.
- [17] Kalemba D., Kunicka A., (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- [18] Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food and Microbiology*, 94: 223-253.
- [19] AFNOR (Association Française de Normalisation) 2000. Recueil des normes françaises "huiles essentielles". Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris.
- [20] Benbouali M., (2006).Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de "Mentha rotundifolia et Thymus vulgaris". Magister, Génie chimique, Université Hassiba Ben Bouali –Chlef, 6-10 ; 17 ; 20-24 ; 29-37 ; 68-73p.
- [21] Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales 3^{ème} édition .éd. Lavoisier. Paris. pp. 263-27622.
- [22] Touré D., (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat, Biochimie, Université Félix Houphouet- Boigny, 5-15 ; 41 ; 49 ; 81p.
- [23] Lakhdar L., (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* : Etude in vitro. Thèse de doctorat, Sciences Odontologiques, Université Mohammed V de Rabat, 6 ; 38-45p.
- [24] Da Silva F., (2010). Utilisation des huiles essentielles en infectiologie ORL. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1, 6 ; 26 ; 29 ; 45p.
- [25] Raymond M., (2005). L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université de Nantes, 25 ; 27 ; 34 ; 42 ; 62 ; 67p.
- [26] El Mansouri K., (2013). Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat, Médecine, Université Cadi Ayyad- Maroc, 19-20p.
- [27] Boughendjioua H., (2015). Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobiennne des huiles essentielles de Citrus limon, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de Doctorat, Biologie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Végétale, Université Badji-Mokhtar – Annaba, 15 ; 24-25 ; 34p.

[28] Boyle W., (1995). Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*, 66: 25-28.

[29] Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouéno B., Menut C., Sohounhloué D., (2012). Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.

[30] Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Guessenn K. N., Boti J.B., Ahibo C., Casanova J., (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. 1:94-103.

[31] Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R., Sarkinas A., (2006). Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 698-703.

[32] Lahlou M., (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18: 435-448.

[33] Amaral J.A., Ekins A., Richards S.R., Knowles R., (1998). Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:520-525.

[34] Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H., (1994). Factors that Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.

[35] Hayes A.J., Leach D.N., Markham J.L., Markovic B.J., (1997). In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *Essential Oil Research*. 9: 575-582.

[36] Tamert A., Latreche A., Aouad L., (2017). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Extracts of *Thymus serpyllum* and *Thymus vulgaris* from the Mount of Tessala (Western Algeria). *Pharmacognosie*, 15: 384-394.

[37] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J. E., Warmington J. R., Wyllie S.G., (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170-175.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [38] Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1914–1920.
- [39] Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N., (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1: 119-128.
- [40] Sikkema J., De Bont, J.A.M., Poolman B., (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59: 201-222.
- [41] Wendakoon C.N., Sakaguchi M., (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58: 280-283.
- [42] Ouis N., (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de Doctorat, Chimie Organique, Université d'Oran 1, 17p.
- [43] Cox S.D., Man C.M., Markham J.L., (2001). Interaction between components of the Essential oil of Melaleuca alternifolia. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 492-497.
- [44] Djeddi S., (2012). Les huiles essentielles pesses Académiques Francophones.
- [45] Garner J., (1976). Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention du contrôle et de l'étude de la composition des huiles essentielles .RIV ; ITAL ; EPPOS, pp.1-12.
- [46] Navesy R., (1964). Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?. Ed. Massan. Paris.
- [47] Ben Habiles. N.H., (1995). Comparaison de huile essentielle de deux espèces des Romarin : *Rosmarinus vicolyse* et *Rosmarinus officialis*. Extraction et études analytiques.
- [48] Mebarki N., (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne. Magister, Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université M'hamed Bougara Boumerdes, 1 ; 14 ; 29-31 ; 51 ; 107p.
- [49] Abdelli W., (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat 3ième cycle LMD, Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 1-2 ; 15-16 ; 31-35 ; 70-72 ; 80 ; 90 ; 104p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [50] AFNOR., (1986). Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles; *AFNOR*; Paris. 57p.
- [51] Hardman/j.g.limbird.l.e.,molinoff.p.b.,rudon.r.w.,gihman.a.g.1996 : les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9^{ème} édition.
- [52] Madi A., (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Magister, Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, 5 ; 17 ; 51 ; 55p.
- [53] Cheurfa M., (2015). Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse de doctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba Ben Bouali – Chlef, 4-7 ; 12 ; 19 ; 27-41p.
- [54] Sutra L., Fderighi J.L., (1998). Manuel de bactériologie alimentaire.
- [55] Ferron A., (1976). Bactériologie (à l'usage des étudiants en médecine). 8^{ème} édition.ed Gouan et Roques. ed. Politerchica. Paris.
- [56] Berche P., Gailard J.L., Simonet M., (1989). Bactériologie: les bactéries des infections humaines. 1^{ère} édition. ed. flammariion. Paris.
- [57] Avril J.L., Daberinat H., Dernis F., Monteil H., (1992). Bactériologie clinique.1^{ère} édition. éd. Marketing, Paris.
- [58] Site d'internet. -www.tanins.com. ; -www.antibiotiques.com.
- [59] Motelh L., (1992). Bactériologie chimique.1^{ère} édition marketing, Paris.
- [60] Leclerh, (1975) : Microbiologie générale, éd. Doin.
- [61] Fiher et Arnoldj R., (2001). L'essentiel en chimie pour biologiste. Berti édition.
- [62] Claude B.H., Josetted W., Freddy D., (1997). Chimie analytique, tome 2, 7^{ème} edition.
- [63] Mémoire de Fin d'étude Promotion (2006). Application des différents procédés d'extraction de coriandrun sativum. l'étude analytique.
- [64] Abbesse B. : Spectroscopie rappelles et cours, exercices et problèmes corrigés.
- [65] Medjekane M., (2017). Prévalence de l'infection à helicobacter pylori et son inhibition par des molécules bioactives. Thèse de doctorat, nutrition humaine, Université Hassiba Benbouali de Chlef.

ملخص :

عائلة الشفويات تشمل حوالي 3000 صنف وهي تنتشر بكثرة في الجزائر نجد من بينها نبتة الميقن تهدف هذه الدراسة لاستخلاص الزيوت الأساسية لنبتة الميقن واستعماله في دراسة الفعالية المضادة للبكتريا وكذلك الدراسة الفيتو كيميائية ومن خلال هاته النتائج المتحصل عليها نجد أن :
المردود المتحصل عليه والذي يقدر ب 2.42% يعتبر مقبول جدا
وكذلك فعالية الزيت المستخلص كبيرة مع بعض السلالات البكتيرية مقارنة مع بعض المراجع

الكلمات المفتاحية : الميقن – الزيوت الأساسية – الفعالية البكتيرية

Résumé :

La famille les lamiacées compte environ 3 000 espèces, est largement répandue en Algérie parmi eux, on trouve la *Melissa officinalis*. Le but de cette étude est d'extraire les huiles essentielles de cette espèce, ainsi que l'étude de l'activité antibactérienne et l'étude phytochimique. A travers ces résultats, nous constatons que:

Le rendement estimé de 2,42% est très acceptable.

Ainsi que l'efficacité de l'huile essentielle est importante vis-à-vis certaines souches bactériennes par rapport à certaines références.

Mots-clés: huiles essentielles - activité antibactérienne-*Melissa officinales*.