



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Biologie Et Ecologie Végétale** : قسم

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biologie et physiologie végétale**

**Option : Métabolisme secondaire et molécules bioactives**

Intitulé :

---

**Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes chez  
l'espèce (*Melissa Officinalis* L.) et évaluation de leur pouvoir  
antibactérien**

---

**Présenté et soutenu par : YOULA AMIRA**

**LATROUS IMED EDDINE**

**Le : 18/06/2017**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mr KARA Youcef (Professeur - UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme BOUCHOUKH Imane (MAA - UFM Constantine).

**Examineurs :** Mme AOUAIDJIA Nawel (MCB - UFM Constantine).

*Année universitaire  
2016 - 2017*

# *Remerciements*

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce travail.

On remercie énormément Pr. Kara youcef (université Constanine 1) d'avoir accepter de présider le jury.

On veut également remercier madame AOUAIDJIA, on exprime notre reconnaissance de nous avoir l'honneur d'être l'examinatrice.

On tient à remercier sincèrement madame BOUCHOUKH, notre encadreur, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour nous avoir guidés dans notre travail. Ses conseils pour le bon déroulement de ce travail et pour sa gentillesse.

Un grand merci particulier à nos collègues et nos amies pour leur sympathie, leur aide, leur disponibilité et leur fidélité.

Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a aidés de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.

# *Dédicace*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chère,*

## ***A MA CHÈRE MÈRE***

*Aucun dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction ma compagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

## ***A LA MEMOIRE DE MON PÈRE***

*Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.*

*J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il est apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme, puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

## ***A MES SOEURS MES AMIS ET MES PROCHEs***

***IMED***

## *Dédicace :*

*Je dédie ce travail :*

*À mes chers parents.*

*À mes sœurs que j'aime beaucoup.*

*À mon cher frère fayçal pour sont soutien et sont encouragement  
tout au long de la réalisation de ce travail.*

*À mes amis boutheina, mira . . .*

*À mon collègue du travail samy qui grâce à lui j'ai pu complir  
mon travail.*

**Résumé :**

La mélisse officinale (*Melissa officinalis* L.) est une plante herbacée de la famille des Lamiacées utilisée depuis l'Antiquité. Ce sont les feuilles de *Melissa officinalis* qui sont utilisées en thérapeutique avec un extrait-hydroalcoolique constitué de flavonoïdes.

Notre travail porte sur une étude qualitative et quantitative de la nature chimique de composés importants du métabolisme secondaire qui sont les flavonoïdes.

Le criblage préliminaire basé sur des tests spécifiques a confirmé la présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques notamment les flavonoïdes, L'analyse qualitative des extraits par chromatographie sur couches minces « CCM » a révélé la présence d'un certain nombre des composés phénoliques.

Ce travail a été complété par une évaluation de la possibilité et l'efficacité de ces composés dans le pouvoir antibactérien sur deux types de bactérie. qui montre des résultats positifs.

**Mots clés :**

*Melissa officinalis* -Métabolisme secondaire –flavonoïdes – Chromatographie sur couche mince (CCM) – Activité antibactérienne.

## **Summary :**

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a herbaceous plant of the family Lamiaceae used since antiquity. The melissa leaves are used in therapeutics with a hydroalcoholic extract consisting of flavonoids. Our work focuses on a qualitative and quantitative study of the chemical nature of secondary metabolism compounds are flavonoids.

The preliminary screening based on specific tests confirmed the presence of substances having high therapeutic values, in particular flavonoids. The qualitative analysis of the extracts by thin-layer chromatography (TLC) revealed the presence of a certain number of phenolic compounds.

This work has been completed to evaluate the possibility and efficacy of these compounds in the antibacterial potency on two types of bacteria, which shows positive results.

## **Keywords :**

Medicinal plant(*Melissa officinalis* L.) - Secondary metabolism - flavonoids - Thin layer chromatography (TLC) ) - Antibacterial activity.

## المخلص :

الميليسا (*Melissa officinalis L.*) هي نبتة عشبية من العائلة الشفوية تستعمل منذ العصور القديمة . أوراق الميليسا هي التي تستخدم علاجيا مع مستخلص كحولي مشكلة فلافونويد يركز عملنا على دراسة نوعية و كمية حول الطبيعة الكيميائية للمركبات الايضية الثانوية الفلافونويدات . و أكد الفحص الأولي المستند على اختبارات محددة وجود مواد ذات قيمة علاجية عالية خصوصا الفلافونويدات و كشف التحليل النوعي باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود عدد من المركبات الفينولية . و قد أنجز هذا العمل لتقييم إمكانية و فعالية و قدرة المضاد البكتيري لهذه المركبات في نوعين من البكتيريا و قد أظهرت نتائج ايجابية .

## الكلمات المفتاحية :

النباتات الطبية - *Melissa officinalis L.* - الابض الثانوي - فلافونويدات - كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) - النشاط المضاد للبكتيريا

# Sommaire

## PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

### Chapitre I – Description de la plante :

I.1. La Famille des Lamiacées .....	3
I.2. Description de la plante .....	4
I.3. Origines .....	5
I.4. Constituants principaux .....	6
I.5. Taxonomie de l'espèce .....	6
I.6. Histoire de l'utilisation de la mélisse en phytothérapie .....	6
I.7. Propriétés médicinales de la mélisse .....	7

## CHAPITRE II : métabolisme secondaire

II.1. Définition .....	8
II.2. Fonction des métabolites secondaires .....	8
II.2.1. Fonctions pour la plante .....	8
II.2.1.1. La coopération avec les animaux .....	8
II.2.1.2. Lutte contre la compétition avec d'autres plantes .....	8
II.2.1.3. Protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores .....	8
II.2.2. Rôle pour l'Homme .....	8
II.2.2.1. Utilisation en médecine .....	9
II.2.2.2. En Agriculture .....	9
II.2.2.3. En alimentation .....	9
II.2.2.4. En cosmétique .....	9
II.3. Classification des métabolites secondaires .....	10



<b>II.3.1. Les composés phénoliques</b> .....	10
<b>II.3.1.1. Définition</b> .....	10
<b>II.3.1.2. Structure chimique</b> .....	10
<b>II.3.1.3. Rôle des composés phénoliques chez les plantes</b> .....	10
<b>II.3.1.4. Principales classes des composés phénoliques</b> .....	11
<b>II.3.1.4.1. Les acides phénoliques</b> .....	11
a. <b>Acides hydroxycinamiques</b> .....	11
b. <b>Acides hydroxybenzoïques</b> .....	12
<b>II.4. Les flavonoïdes</b> .....	12
<b>II.4.1. Définition</b> .....	12
<b>II.4.2. Structure des flavonoïdes</b> .....	13
<b>II.4.3. Couleur des flavonoïdes</b> .....	13
<b>II.4.4. Les différentes classes des flavonoïdes</b> .....	14
<b>II.4.4.1. les flavones</b> .....	14
<b>II.4.4.2. Les flavonols</b> .....	14
<b>II.4.4.3. Les dihydroflavonols ou flavanonol</b> .....	15
<b>II.4.4.4. Les flavanones</b> .....	15
<b>II.4.4.5. Les Aurones</b> .....	16
<b>II.4.4.6. Les chalcones</b> .....	16
<b>II.4.4.7. Les dihydrochalcones</b> .....	17
<b>II.4.5. Propriété physio-chimique des flavonoïdes</b> .....	17
<b>II.4.5.1. Solubilité des flavonoïdes</b> .....	17
<b>II.4.5.2. Absorption des rayonnements UV</b> .....	19
<b>II.4.5.3. Stabilité des flavonoïdes</b> .....	19
<b>II.4.6. Propriété biologique</b> .....	21
<b>II.4.6.1. Activités antimicrobiennes</b> .....	22
<b>II.4.6.1.1. Activité antibactérienne</b> .....	22
<b>II.4.6.1.2. Activité antifongique</b> .....	24
<b>II.4.6.1.3. Activité antivirale</b> .....	24
<b>II.4.6.2. Activités antiparasitaires</b> .....	25
<b>II.4.7. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires</b> .....	25

II.4.8.inhibiteur enzymatique .....	28
II.5. Les Coumarines .....	29
II.6. Les Tanins .....	29
II.7. Les Terpènes .....	30
II.8. Les alcaloïdes .....	30

## Partie II : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel végétal .....	31
II. Criblage des flavonoïdes .....	31
III. Extraction des flavonoïdes .....	33
III.1. Macération et préparation des extrait méthanolique et éthanolique ..33	
III.2. Préparation des extraits méthanoliques .....	33
III.3.Préparation des extraits éthanoliques .....	34
III.4. Fractionnement l'extrait méthanolique par extraction liquide-liquide (ELL) .....	36
III.5.Fractionnement l'extrait éthanolique par extraction liquide- liquide (ELL) .....	38
IV. Séparation des flavonoïdes par la chromatographie sur couche mince (CCM) .....	40
IV.1. Principe .....	40
IV. 1. Préparation de la phase mobile (l'éluant) .....	40
IV.2. Préparation de la phase stationnaire .....	41
IV.3. La préparation de la cuve .....	41
IV.4. Dépôts de l'échantillon .....	41
IV.5. Développement de la chromatographie .....	41
IV.6. La révélation .....	42
V. Etude de l'activité antibactérienne .....	42
V.1.Objectif .....	42
V.2.Principe .....	42
V.3.Préparation de la souche bactérienne .....	43
V.4.Préparation du milieu de culture .....	43
V.5.Préparation des disques .....	43
V.6. Culture des bactéries .....	43

V.7. Dépôt des extraits .....	43
-------------------------------	----

### **Partie III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Criblage des flavonoïdes .....</b>	<b>46</b>
<b>I.1. Résultats .....</b>	<b>46</b>
<b>I.2. Discussion .....</b>	<b>47</b>
<b>II. Séparation des extraits brute MeOH et EtOH par la chromatographie sur couche mince (CCM) .....</b>	<b>47</b>
<b>II.1. Résultats .....</b>	<b>47</b>
<b>II.2. Discussion .....</b>	<b>49</b>
<b>III. Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes .....</b>	<b>50</b>
<b>III.1. Résultats .....</b>	<b>50</b>
<b>III.2. Discussion .....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>54</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>54</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> <i>Melissa officinalis</i> .....	3
<b>Figure 2 :</b> Structure des flavones .....	14
<b>Figure 3 :</b> Structure des flavonols .....	15
<b>Figure 4 :</b> Structure des flavanonols .....	15
<b>Figure 5 :</b> Structure des flavanones.....	16
<b>Figure 6 :</b> Structure des aurones.....	16
<b>Figure 7 :</b> Structure des chalcone.....	17
<b>Figure 8 :</b> Exemples d'autoxydation de flavonoïdes .....	20
<b>Figure 9 :</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	27
<b>Figure 10 :</b> Structure des coumarines .....	29
<b>Figure 11 :</b> Les plantes utilisées de <i>Melissa officinalis</i> .....	31
<b>Figure 12 :</b> Protocole du screening phytochimique des flavonoïdes.....	32
<b>Figure 13 :</b> L'évaporateur rotatif .....	34
<b>Figure 14 :</b> Protocole de la préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques..	35
<b>Figure 15 :</b> Protocole des fractionnements de l'extrait méthanolique par ELL .....	37
<b>Figure 16 :</b> Protocole des fractionnements de l'extrait éthanolique par ELL .....	39
<b>Figure 17 :</b> Schéma de l'analyse CCM des flavonoïdes des extraits des feuilles de la mélisse.....	42
<b>Figure 18 :</b> Protocole du test de l'activité antibactérienne des extraits (Technique des disques).....	45
<b>Figure 19 :</b> Les résultats de criblage des flavonoïdes des feuilles de <i>Melissa officinalis</i> .....	46
<b>Figure 20 :</b> Chromatogramme des différent phases de nos extrait méthanolique et éthanolique .....	48
<b>Figure 21 :</b> Révélation par UV (250 nm) de nos extraits méthanolique et Ethanolique.....	48

**Figure 22 :** Résultats sur boîtes de Pétri de l'inhibition de *Staphylococcus* par les extraits flavonoïques de *Melissa officinalis* .....51

**Figure 23 :** Résultats sur boîtes de Pétri de l'inhibition de *E. coli* par les extraits flavonoïques de *Melissa officinalis*.....52

## Liste des tableaux

<b>Tableau1:</b> Composition en volume de la phase mobile utilisée en CCM .....	40
<b>Tableau2:</b> Résultats des tests de criblage des flavonoïdes.....	46
<b>Tableau 3:</b> Les rapports frontaux des différents spots des extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de <i>Melissa officinalis</i> .....	49
<b>Tableau 4:</b> Résultats de l'activité anti bactérienne des extraits flavonoïques de <i>Melissa officinalis</i> .....	50

## List des abbreviations

%: Pourcentage.

°C: Degré celsius

AND: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

C : Carbon

CCM: Chromatographie sur couche mince

Cm: Centimeter

Cu+: Cuivre

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

EtOH : éthanol

F AE: Phase Acétate D'éthyle

F aq: Phase Aqueuse

F bu: Phase Butanol

F ED: Phase ether Di-éthylique

Fe<sup>3+</sup>: Fer ferrique.

g : Gramme

h : Heur

H : Hydrogen

H<sub>2</sub>O: Eau

HCL: Chlorure d'hydrogène

l : Litre

MeOH: Méthanol

MeOH: Méthanol

Mg: Magnesium

mg: Milligramme

ml: Milliliter

Mm: Millimètre

MRP : Multidrug resistance protein

NADH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide

nm : Nanomètre

O : Oxygène

OH : Hydroxyde

P : Longueur d'onde

PH : Potentiel hydrogène

PM : Poids moléculaire

PP : Polyphénol

PTK : Protéine kinase

RF : Rapport frontal

SAMR : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

SM : Métabolisme secondaire

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TNF : Facteur de nécrose tumoral

UV : Ultra violet

V : Volume

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine



**Introduction générale :**

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique (Svoboda, 2000). De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne (Bourgaud *et al*, 2001 ; Kar, 2007).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médicaux. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (Kar, 2007). Notre plante la mélisse officinalis est connue pour sa richesse en produits du métabolisme secondaire et particulièrement en huiles essentielles et alcaloïdes tenin ... (Baba aissa, 1999).

L'histoire des plantes médicinales est associée à l'évolution des civilisations dans toutes les régions du monde. L'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine et dans la composition des parfums et des préparations culinaires.

Dans la civilisation chinoise indienne, on trouve la trace d'utilisation médicinale très anciennes, le premier livre de matière médicale était le Shen Nung Ben Cao Jing : Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung. (2900-4000 av. J-C.). Les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leur vertu curative (Fouché et al. 2000). Le soin de la peau a commencé 3000 ans av. J -C quand les égyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (Dweck, 2002).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5<sup>ème</sup> siècle av. J-C) utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des vomitifs (Fouché et al., 2000). Dioscoride avec sont traité sur près de 500 plantes répertoriées au cours de ces explorations.

Les arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie, Ibn al baytar (1197-1248) qui rédigea le très complet somme des simples, ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales (Fouché et *al.*, 2000).

C'est vers 1865 que le docteur Auguste soïn donne le nom de « Phytothérapie » pour définir la médecine par les plantes (Bernadet, 2000).

En 1928, le chimiste Gatefossé qui découvrit l' « aromathérapie » en travaillant sur les parfums, suite à un accident, et il a prouvé les vertus de l'huile essentielle. Plongeant par réflexe sa main brûlée lors d'une explosion dans le premier liquide à proximité ; il nota une guérison rapide et sans infection. Ce liquide n'était autre que de l'huile essentielle de lavande. Il inventa le terme Aromathérapie et étudia de manière plus approfondie les propriétés de ces huiles.

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (Newman *et al.*, 2000 et Calixto 2005).

L'objectif de notre travail c'est l'évaluation de la richesse de la mélisse (*Melissa officinalis*) en métabolites secondaires, particulièrement les flavonoïdes. Pour atteindre cet objectif, nous avons extrait les flavonoïdes par des affrontements avec plusieurs solvants, puis une séparation chromatographique sur une couche mince de gel de silice qui a révélé un nombre importants de flavonoïdes séparés.

Pour compléter notre étude, une évaluation du pouvoir antibactérien était nécessaire pour tester la capacité de ces composés flavonoïques d'inhiber le développement de deux bactéries, une à gram+ et l'autre à gram-.

**PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE****Chapitre I – Description de la plante :****I.1. La Famille des Lamiacées :**

Les plantes de la famille des lamiacées est une assez grande famille, on en dénombre plus de six mille espèces recensées dans près de deux cent dix genres.

La famille des lamiacées se compose surtout de plantes herbacées et des arbustes, quelques arbres et lianes y sont associés, cette famille est économiquement parlant une famille ayant de l'importance puisqu'elle permet de produire des huiles essentielles, des condiments ainsi que des infusions très prisées et fournissant des antibiotiques naturels utilisés en aromathérapie, en cosmétique aussi pour les parfums et les produits pour la peau.

Les feuilles sont opposées, disposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre, dépourvues de stipules, à limbe généralement denté. La tige est à section carrée. La plupart du temps les fleurs sont zygomorphes à symétrie bilatérale, mais parfois presque radiaire, généralement hermaphrodites. L'inflorescence est en cymes, souvent réunies en faux-verticilles étagés, axillaires ou terminaux ; rarement fleurs isolées.

Le calice est à 5-12 lobes égaux ou disposés en deux lèvres. La corolle est généralement caduque, constituée d'un tube se terminant par 4 ou 5 lobes, soit subégaux, soit formant une lèvre inférieure (la supérieure étant très réduite), soit le plus souvent formant 2 lèvres. Par tube de la corolle, il faut entendre la partie basilaire, plus ou moins cylindrique, de cet organe. Les étamines sont insérées sur le tube de la corolle ; soit accompagnées parfois de 2 autres étamines stériles et réduites ; soit 4, en 2 paires souvent inégales. Les carpelles sont deux, soudés entre eux ; ovaire supère, à 4 ovules ; 1 style bifide, naissant le plus souvent entre les lobes de l'ovaire.

À la fructification, une fausse-cloison divise chaque carpelle en 2, formant ainsi un tétrakène.

Les Lamiacées possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles les rendant très odorantes.

La forme et la position des étamines comme celles des lobes de la corolle, jouent un rôle important dans la détermination et ne s'apprécient bien qu'à l'aide de matériel frais : on notera tout particulièrement si les étamines dépassent nettement, ou non, les lobes de la corolle. La couleur de celle-ci et l'odeur de la plante au froissement doivent également être notées sur des exemplaires frais.

Chez diverses espèces de cette famille, existent fréquemment dans les populations naturelles, à côté d'individus hermaphrodites, des plantes dont toutes les fleurs (ou parfois seulement une partie d'entre elles) sont exclusivement femelles ; celles-ci présentent des étamines avortées ou rudimentaires.

De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles.

### I.2. Description de la plante :



**Figure1** : *Melissa officinalis*

La mélisse officinale (*Melissa officinalis*) est une plante herbacée vivace de la famille des Lamiacées. Son nom vient du grec *melissophullon*, qui signifie « feuille à abeilles ».

On la nomme également : Citronnelle, Citronnade, Céline, Piment des ruches, Thé de France, Piment des abeilles, Herbe au citron.

La mélisse est une plante dont les feuilles dégagent une odeur de citron et dont les principes actifs lui confèrent des vertus apaisantes, lui permettant de réduire les effets du stress et de dissiper les troubles digestifs d'origine nerveux. En phytothérapie, les suppléments de Mélisse sont principalement utilisés en tant que calmant.

Les principes actifs de la mélisse sont contenus dans l'huile essentielle. De part ses propriétés relaxantes, sédatives et antispasmodiques, la mélisse est particulièrement efficace pour lutter contre le stress et l'anxiété, ainsi que pour traiter les troubles digestifs d'origine nerveuse. Son nom nous vient du grec "*melissophullon*" qui signifie "feuille à abeilles".

La mélisse est une plante mesurant de 30 à 80 cm de hauteur. Elle présente des tiges dressées, à section carrée, ramifiées et velues. Les feuilles, opposées, pétiolées et cordiformes, sont de couleur verte foncée sur la face supérieure et vert pâle sur la face inférieure. Elles sont rugueuses au toucher et d'un aspect gaufré caractéristique. Elles dégagent, lorsqu'on les froisse, une odeur citronnée très douce, à l'origine de son nom de "Citronnelle".

Les fleurs sont blanches ou rosées et en forme de cloche. Elles apparaissent à l'aisselle des feuilles et produisent un nectar très apprécié des abeilles qui l'utilisent pour produire le miel. Les fruits sont des tétrakènes de couleur brune, contenant des graines luisantes de couleur brun foncé.

L'odeur de citron, dégagée par les feuilles lorsqu'on les froisse, est due à l'huile essentielle contenue dans les poils épidermiques sécréteurs. Cette odeur est d'autant plus évidente que la plante est sèche.

Il semblerait que la plante trop âgée troquerait son odeur citronnée contre une odeur de punaise. C'est pour cette raison que la récolte de la mélisse doit avoir lieu tôt dans la saison, au moment de la floraison.

### **I.3. Origines :**

Originnaire d'Asie Mineure, vraisemblablement de Turquie, on la retrouve dans toutes les régions tempérées du globe. Elle pousse sous forme de touffe dans les lieux frais et ombragés jusqu'à 1000 m d'altitude. Elle pousse de manière spontanée dans le sud de l'Europe mais en France, on la cultive particulièrement en Anjou, en Provence et à Milly, près de Paris. Elle a sa place dans les jardins d'herbes aromatiques car elle apporte une saveur fraîche aux salades et aux boissons.

Les premières utilisations de la mélisse remontent à la Grèce antique. Les médecins utilisaient déjà la mélisse contre les troubles du système nerveux. Les médecins arabes, quant à eux, vantaient ses vertus antispasmodiques.

Elle n'est arrivée dans la pharmacopée Française que vers la fin du Moyen-âge, époque à laquelle elle servait de base à de nombreux élixirs et liqueurs, produits par des Monastères. La bénédictine, la chartreuse et l'Eau de mélisse des Carmes (alcoolat de mélisse composé, créé en 1611 par les religieux d'un carmel) sont parmi les plus célèbres.

Ces élixirs et liqueurs associaient généralement de nombreuses autres plantes à la mélisse. Depuis, de nombreuses études ont été faites, notamment en Allemagne. En 1978, les propriétés antivirales de la plante ont été mises à jour, complétées dans les années 90 par des recherches sur l'effet de la mélisse sur le virus de l'herpès.

**I.4. Constituants principaux :**

La plante de mélisse fraîche est composée de 0,01% d'huile essentielle, tandis que la plante sèche en contient 0,05%.

L'huile essentielle est constituée elle-même de :

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

Les autres composants de la mélisse sont :

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

**I.5. Taxonomie de l'espèce :**

**Domaine :** Biota

**Règne :** Plantae

**Sous- Règne :** Viridaeplantae

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Equisetopsida

**Sous- Classe :** Magnoliidae

**Super- Ordre :** Asteranae

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** Lamiaceae

**Genre :** *Melissa* L.

**Espèce :** *Melissa officinalis* L.

**I.6. Histoire de l'utilisation de la mélisse en phytothérapie :**

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 traitement antiviral. Dans le monde contemporain, la mélisse est utilisée en phytothérapie pour traiter l'anxiété et les troubles nerveux ainsi que les problèmes gastro-intestinaux. Elle est également utilisée pour son effet stimulant sur la fonction cérébrale et son efficacité dans le traitement de l'insomnie.

#### **I.7. Propriétés médicinales de la mélisse :**

- 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.
- Lutte contre les infections virales : herpès labial et génital, zona. Névralgies et blessures mineures. Relaxation des muscles et des nerfs : muscles et nerfs tendus
- Calmant (troubles nerveux, stress, anxiété, angoisse), antispasmodiques (estomac, intestin), infections virales (herpès, zona), problèmes cardiaques (tachycardie), troubles du sommeil (insomnies), digestif, stimulant de la mémoire, blessures externes et névralgies, protecteur de l'organisme.

## CHAPITRE II : Métabolisme secondaire

### II.1. Définition :

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (Guillaume, 2008).

Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

### II.2. Fonction des métabolites secondaires :

#### II.2.1. Fonctions pour la plante :

##### II.2.1.1. La coopération avec les animaux :

Les métabolites secondaires peuvent être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs ou pollinisateurs : certains métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux (monoterpènes parfumées, anthocyanes de couleur ou de caroténoïdes dans les fleurs), nécessaires à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs.

##### II.2.1.2. Lutte contre la compétition avec d'autres plantes :

Les métabolites secondaires participent à des réponses allélopathiques : compétition entre les plantes pour la germination et croissance au moyen de toxicité qui empêchent la croissance des autres plantes compétitrices.

##### II.2.1.3. Protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores :

Il ya plus de 100 ans Ernst Stahl a montré expérimentalement que les métabolites secondaires servent de composés de défense contre les escargots et autres herbivores (Wink, 2003).

#### II.2.2. Rôle pour l'Homme :

Les métabolites secondaires végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés sont en grande mesure illustrés en thérapeutique (Bahorun, 1997).



**II.2.2.1. Utilisation en médecine :**

Les métabolites secondaires qui font la base des remèdes pour l'Homme :

- En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux.

- Systèmes cardiovasculaires, ex : Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose.

- Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoire extraits des plantes *Melaleuca alternifolia* et *Echinacea angustifolia*.

- Contre le diabète (*Azadirachta indica*).

- Les maladies du stress, ces métabolites ont une activité antioxydante, tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine (Lee *et al.*, 2005).

- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: depuis des périodes très anciennes ces substances naturelles ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques tels : la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*" a été avec succès employée pour traiter le malaria, Et l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé aussi pour ses propriétés : anti-infectieux, antifongiques, mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH (Mohammedi, 2006).

**II.2.2.2. En Agriculture :**

Les huiles de l'arbre *Azadirachta indica* ont des utilisations dans l'agriculture, dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites).

**II.2.2.3. En alimentation :**

Les épices et les herbes aromatiques contenant des diverses métabolites sont utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table, considérées comme condiments et aromates, ont été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques. Mais également ces métabolites trouvent leur utilisation comme suppléments diététiques (Mohammedi, 2006).

**II.2.2.4. En cosmétique :**

Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (Mohammedi, 2006).

### **II.3. Classification des métabolites secondaires :**

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003, Haven *et al.*, 2000).

#### **II.3.1. Les composés phénoliques :**

##### **II.3.1.1. Définition :**

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Fleuriet, 1982 ; Yusuf, 2006).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière (Nkhili, 2009).

Ils ont largement distribués et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997). Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit à l'Homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert *et al.*, 2005).

##### **II.3.1.2. Structure chimique :**

Les polyphénols sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Manallah, 2012).

##### **II.3.1.3. Rôle des composés phénoliques chez les plantes :**

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant

certaines insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (Maillard, 1996).

#### **II.3.1.4. Principales classes des composés phénoliques :**

On distingue les acides phénoliques (phénols simples), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les tannins (Glombitza, 1985 ; Harborne, 1980 ; Goodwin, 1988 ; Porter, 1989; Boros, 2010)

##### **II.3.1.4.1. Les acides phénoliques :**

Ces composés sont dérivés de deux sous groupes distingués : Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique, et les acides hydroxybenzoïque, mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique. Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Et présents chez toutes les céréales.

Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques.

Les mieux caractérisés pharmacologiquement, sont l'acide caféique et l'acide ferulique qui montrent l'effet anticancéreux au niveau des poumons chez les souris, alors que l'acide gallique agit par le même effet en prévenant le déclenchement du cancer oesophagien chez les rats (Laraoui, 2007).

#### **a- Acides hydroxycinnamiques :**

##### **• Acide ferulique :**

L'acide ferulique est identifié dans les grains d'orge, maïs, mils, avoine, seigle, blé, riz. Cet acide a comme principale propriété biologique, l'effet antioxydant (Hahn et *al.*, 1983 ; Andreasen et *al.*, 2000; Zhou et *al.*, 2004; Kim et *al.*, 2006).

**• Acides chlorogéniques :**

Les acides chlorogéniques sont identifiés essentiellement chez : les artichauts, Café, pomme de terre..., Sont caractérisés par des propriétés antioxydantes et antiradicalaires, comme ils jouent un rôle dans la prévention *in vitro* des maladies cardiovasculaires et du diabète type II.

**• Acide caféique :**

L'acide caféique est abondant dans l'orge, maïs, mils, avoine, seigle, blé, riz et le sorgho (Suba *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2006).

L'acide caféique est un composé naturellement présent dans toutes les plantes, intervenant dans la synthèse de la lignine (molécule formant les parois des cellules végétales). A des propriétés, antitumorales, antivirales, antiradicalaires et anti-inflammatoires, il a été employé comme antioxydant naturel pour inhiber l'oxydation des lipides de poisson dans les matrices alimentaires (Cunha, *et al.* ; 2004).

**b- Acides hydroxybenzoïques :**

Le plus important c'est l'acide gallique qui est abondant dans le mils, riz, sorgho (Hahn *et al.*, 1983; Suba *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2004). Cet acide présente une très grande activité antioxydante (Smith et Kramer, 1999).

L'acide gallique a pour pouvoir *in vitro* de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon chez les souris et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Kawada *et al.*, 2001 in Rangkadilok *et al.*, 2007).

Il peut aussi à une faible concentration, prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire (Lee *et al.*, 2005).

**II.4. Les flavonoïdes :****II.4.1. Définition :**

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, 2006). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havasteen, 2002).

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires (Erlund, 2004), où ils peuvent être localisés dans divers organes : racine, tiges,

bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier (Delporte *et al.*, 1999).

#### II.4.2. Structure des flavonoïdes

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C<sub>6</sub>, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous) (Bruneton, 1999).

La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

#### II.4.3. Couleur des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH). Les jaunes viennent des chalcones, aurones et flavonols jaunes, les rouges et les mauves des anthocyanosides, les bleus trouvent leurs origines dans les co-pigments flavones-anthocyanosides. L'absorption dans l'ultraviolet produit des motifs perceptibles par les insectes et capables de les guider vers le nectar .

Les pigments colorés des fleurs servent à attirer les insectes pollinisateurs. Ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs.

On trouve ces pigments dans le rouge des pommes et des poires, dans les baies de genièvre, le miel, le raisin et le vin.

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes sont hydrosolubles et s'accumulent dans les vacuoles.

#### II.4.4. Les différentes classes des flavonoïdes :

##### II.4.4.1. les flavones :

Les flavones (du latin *flavus*, jaune) sont une sous-famille des flavonoïdes dont la structure est basée sur la flavone (2-phényl-1-benzopyran-4-one ou 2-phénylchromén-4-one). Ce sont des colorants végétaux jaunes dont environ 300 composés naturels sont connus. Comme d'autres flavonoïdes (hypéroside, quercitrine), elles sont parfois présentes sous forme d'hétérosides solubles dans l'eau. On les trouve parfois comme co-pigment avec les anthocyanes.

- aglycones : lutéolol : dans le thym, la sauge officinale, apigénol dans la bière, la ciboule, la marjolaine,
- leurs hétérosides : lutéolol 7-O-glucoside, dans les feuilles et les graines de céleri
- dérivés méthoxylés : tangérétine, nobilétine, dans le jus d'orange

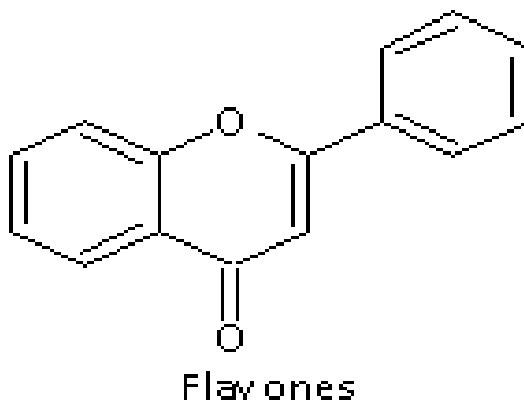


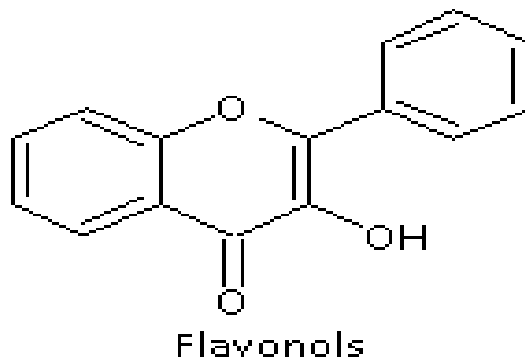
Figure 2 : Structure des flavones

##### II.4.4.2. Les flavonols :

Les flavonols sont un sous-groupe de flavonoïdes dérivés de la 3-hydroxyflavone (3-hydroxy-2-phénylchromén-4-one en nomenclature IUPAC) ou flavonol, c'est-à-dire des flavonoïdes possédant un hydroxyle phénolique en C3 et une fonction carbonyle C=O en C4 sur l'hétérocycle central du squelette de base des flavonoïdes. Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair. Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxyle phénolique –OH, parfois méthylés (groupes méthoxy).

- réputés être les antioxydants les plus efficaces des flavonoïdes, très nombreux
- les aglycones : environ 380, kaempférol, dans les câpres, les mures, les tomates ; quercétol, dans le piment, le cacao ; myricétol dans la bière, le vin rouge, la ciboule ; fisétine
- leurs hétérosides : nombreux dans les produits alimentaires comme le *kaempférol 3-O-*

*glucoside* dans le vin rouge, les framboises, les haricots communs  
- les dérivés méthoxylés : rhamnétine



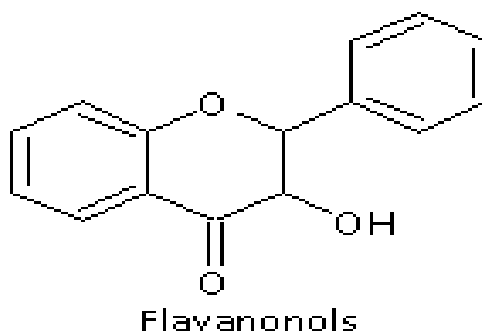
**Figure 3 :** Structure des flavonols

#### II.4.4.3. Les dihydroflavonols ou flavanonol :

Les flavanonols (3-hydroxyflavanone ou 2,3-dihydroflavonol) sont une classe de flavonoïdes dérivant de la 3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phenylchromén-4-one.

On peut notamment citer parmi les flavanonols la taxifoline (ou dihydroquercétine) et l'aromadédrine (ou dihydrokaempférol)

sans double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> par rapport au précédent  
- aglycones : dihydroquercétol dans l'origan américain *Lippia graveolens*  
- leurs hétérosides : dihydroquercétol 3-O-rhamoside, dans le vin rouge



**Figure 4 :** Structure des flavanonols

#### II.4.4.4. Les flavanones :

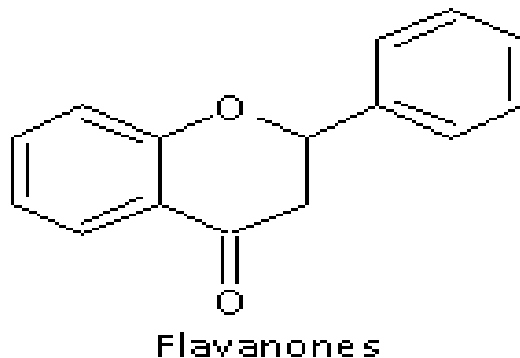
Les flavanones sont un sous-groupe de flavonoïdes, dérivés 2,3-dihydrogénés des flavones. Elles sont généralement glycosylées par un disaccharide en position 7 pour

donner des hétérosides de flavanones.

- aglycones : surtout présents dans les agrumes : ériodictyol dans la marjolaine; naringétole, dans le pomelo

- leurs hétérosides : naringine, dans le pamplemousse, l'orange

- leurs dérivés méthoxylés : homoeriodictyol dans l'*Herba Santa*

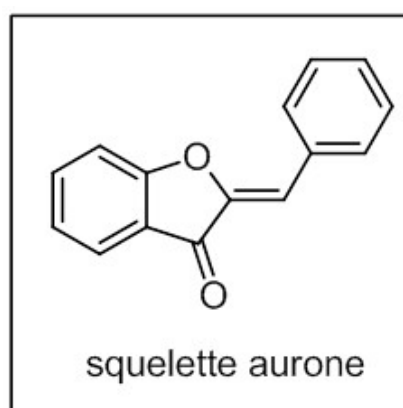


**Figure 5 :** Structure des flavanones

#### II.4.4.5. Les Aurones :

Les aurones sont une classe restreinte de flavonoïdes (quelques dizaines d'aurones naturelles sur près de 4000 flavonoïdes) présente naturellement dans certaines fleurs, comme le Muflier, le Dahlia ou le Coréopsis, et qui leur confère leur couleur jaune d'or<sup>1</sup>. Isomères structuraux des flavones, les aurones peuvent présenter des propriétés biologiques diverses d'antioxydants, d'anticancéreux ou d'antiparasitaires.

2-benzylidène-coumaranones, : hispidol, Aureusidin



**Figure 6 :** Structure des aurones

#### II.4.4.6. Les chalcones :

La chalcone est une énone aromatique, qui est le noyau d'une classe de composé chimique au rôle important en biologie, les chalcones. Elle est constituée d'une molécule de



prop-2-énal ou acroléine liée à chaque extrémité à un groupe phényle. La chalcone existe donc sous la forme de deux stéréoisomères (Z et E) en fonction de la disposition des substituants autour de la double liaison centrale au cycle pyranique ouvert.

- Aglycones : butéine, dans les fèves
- Des hétérosides, des dérivés méthoxylés et prénylés : xanthohumol dans le houblon et la bière

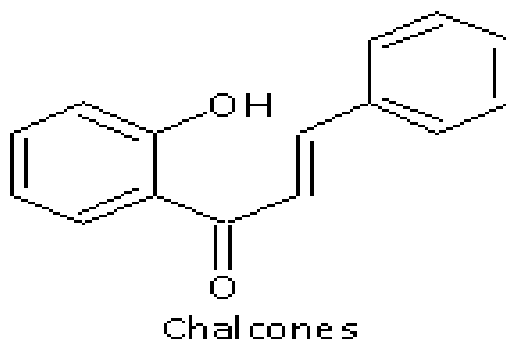


Figure 7 : Structure des chalcones

#### II.4.4.7. Les dihydrochalcones :

La dihydrochalcone (DHC) ou 1,3-diphénylpropan-1-one est un composé chimique proche de la chalcone. Il s'agit d'une molécule de chalcone dont la double liaison centrale (celle de la fonction énone) a été hydrogénée.

- Aglycones : phlorétine dans les feuilles de pommier
- Leurs hétérosides : phloretin 2'-O-xylosyl-glucoside dans les pommes; naringine dihydrochalcone à la saveur sucrée intense; néohespéridine dihydrochalcone édulcorant

#### II.4.5. Propriété physio-chimique des flavonoïdes :

##### II.4.5.1. Solubilité des flavonoïdes :

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes :

- Des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques.
- Des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) .
- Des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde.
- Des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH.

Selon (Saidman *et al.*, 2002) , le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, la solubilité

des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du pH . En effet, à un pH 1.5, la solubilité de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée.

D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10 mg/L . (Benavente-Garcia *et al.* ,2001) ont évalué la solubilité de la néohesperidine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12 g/L et 123 g/L. L'étude de la solubilité dans les solvants organiques a été pas ou peu étudié.

La faible solubilité des flavonoïdes dans les phases aqueuses et lipophiles laisse leurs incorporations dans les formulations pharmaceutiques et alimentaires difficiles. Toutefois, la métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation) de ces composés par les cellules de l'intestin permettent leur absorption par l'organisme.

Pour pallier à ces problèmes de solubilité, différentes techniques ont été utilisées ayant pour but de modifier la structure de ces molécules :

- La glycosylation de la naringine par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus*, a permis l'augmentation de sa solubilité dans l'eau de 250 fois.

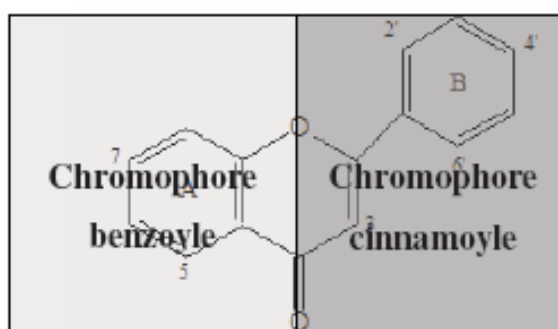
- La complexation de la naringénine et de l'hespéretine avec de la  $\beta$  cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité dans des milieux hydrophiles à différents pH.

- L'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2-phosphonomyo-inositol), l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine. (Cependant, Perrier *et al.* et Sakai *et al.*,1998) ont observé, respectivement, une augmentation de la solubilité de l'hespéretine et de la catéchine dans les phases grâce après acylation par des acides gras.

- La polymérisation de la rutine a permis d'augmenter sa solubilité dans l'eau. (Chebil.L, 2006)

#### II.4.5.2. Absorption des rayonnements UV :

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre (23, 24). Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle comme l'indique le schéma suivant :



Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs.

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet. Pour l'acylation, peu de données existent sur l'effet de cette réaction sur les propriétés spectrales des flavonoïdes. (chebil .L , 2006)

#### II.4.5.3. Stabilité des flavonoïdes :

L'importante réactivité des flavonoïdes donne à ces molécules une instabilité à plusieurs conditions environnantes.

##### • Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes :

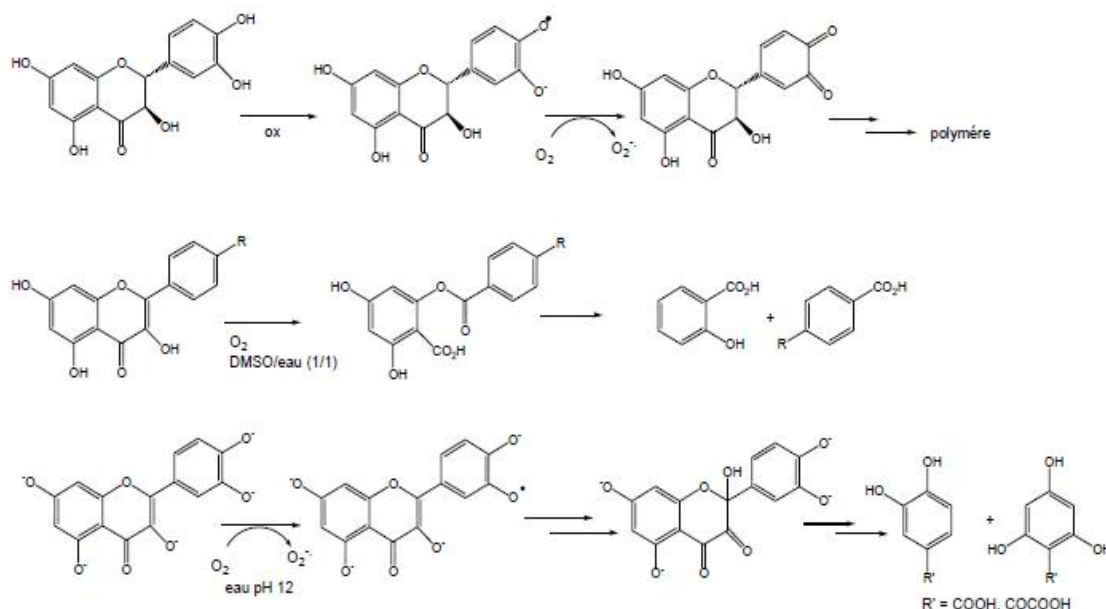
Les paramètres qui peuvent agir sur la stabilité des flavonoïdes sont la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non et d'oxydant. Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. En effet, la stabilité est plus faible à des PH

basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion superoxyde). La nature du solvant affecte le mécanisme de dégradation des flavonoïdes. En effet, lors de l'étude de la dégradation de la quercétine par le DPPH (1-diphényl-2-picrylhydrazyl), (Fargeix, 2000) a observé la formation de produits différents en milieu protique et aprotique. De même, (Tommasini *et al.*, 2004) ont rapporté, lors de l'étude de la photostabilité du 3-hydroxyflavone, des voies de dégradation différentes selon la nature du solvant avec une amélioration de la stabilité en présence de cyclodextrines.

#### • Autoxydation des flavonoïdes :

Les cinétiques et les mécanismes d'oxygénation des flavonoïdes ont été étudiés par (Fargeix,2000) ,( Barhaes *et al.*,2000) , (Balogh-hergovich *et Speier*, 2001) , (Mochizuki *et al.* ,2002) et (Ramos-Tejada *et al.*,2002) . Cependant, le pH, la présence d'ion métallique et de borate affectent l'autoxydation de la catéchine en milieu aqueux.

Les produits formés au cours de l'auto-oxydation sont très variables mettant en évidence des voies de dégradation différentes selon la nature du flavonoïde et des conditions de conservation.



**Figure8** : Exemples d'autoxydation de flavonoïdes

#### • Effet de la structure du flavonoïde sur la stabilité :

La stabilité des flavonoïdes est affectée par la nature du flavonoïde et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). En effet, (Friedman et Jurgens ,2000) ont observé que la stabilité des flavonoïdes et de certains acides aromatiques, vis-à-vis du pH, est plus élevée que dans le cas d'autres composés phénoliques en raison d'une stabilisation accrue par résonance des intermédiaires de type phénoxy et quinoïque. Il a été aussi reporté que la stabilité des flavones à la lumière est plus importante que celle des flavonols .

Ainsi, l'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont donc moins réactifs.

En ce qui concerne l'hydroxylation, (Markris et Rossiter, 2002) n'ont pas observé d'effet sur la stabilité en comparant les mécanismes de dégradation de la quercétine et de la morine. Par contre, le mécanisme de dégradation à la température de la génisteine et de la daidzeine est différent.

D'autre part, (Smith *et al.*, 2000) et ( Makris et Rossiter, 2000) ont comparé des molécules aglycones à des glycosylées et ils ont reporté respectivement que la quercétine 3-galactoside et la rutine ont une photostabilité et une thermorésistance plus élevée que la quercétine.

L'effet de l'acylation sur la stabilité des flavonoïdes a été étudié par (Perrier *et al.* ,1998), (Ishihara et Nakajima, 2003) et ( Svehlikova *et al.*, 2004). Ils ont observé respectivement que la stabilité vis-à-vis de la température, de la lumière et du pH de l'hespéritine, l'isoquercitrine, l'apigénine-7-glucoside a été améliorée par l'introduction de groupements dodécanoate, aromatiques, acétate et malonate. L'effet de l'acylation par les acides aromatiques sur la stabilité a été attribué à des interactions de type hydrophobe intra et/ou intermoléculaire ou à un  $\pi$ - $\pi$  stacking entre la partie génine du flavonoïde et la partie acyle.

L'effet de la polymérisation sur la stabilité de l'épicatéchine a été décrit par (Zhu *et al.*, 2002) . Ils ont reporté que les dimères d'épicatéchine sont plus sensibles au pH que les monomères. (chebil.L, 2006)

#### **II.4.6. Propriétés biologiques :**

Comme il a été présenté précédemment, les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur capacité antioxydante peut aussi

expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques. Les isoflavonoïdes, en tant que phytoestrogènes, possèdent de nombreuses activités biologiques. Toutefois certaines considérations concernant le métabolisme et la biodisponibilité des flavonoïdes sont à prendre en compte. Les flavonoïdes sous leur forme glycosylée ( $\beta$ - glycosides) ne sont pas absorbables. Néanmoins, il existe des enzymes au niveau intestinal capables d'hydrolyser les hétérosides (Crozier et al., 2009). De plus, certains microorganismes présents dans l'intestin sont capables d'hydrolyser les  $\beta$ -glycosides en aglycones et ainsi leur permettre de franchir la barrière intestinale (Hodek et al., 2002). On note également l'action de transporteurs de la famille ABC (Pgp et MRP) qui vont entraîner un efflux des métabolites au niveau intestinal (Crozier et al., 2009). Des inactivations sont également possibles au niveau du métabolisme entéro-hépatique avec notamment l'intervention de cytochromes P450. Les flavonoïdes interagissent avec les cytochromes P450 à plusieurs niveaux : en induisant la biosynthèse de P450 ou en modulant leur activité enzymatique (inhibition ou stimulation). Les flavonoïdes sont aussi métabolisés par les P450, ce qui peut conduire soit à une augmentation de leur activité *in vivo* (métabolite plus actif) soit à une diminution (métabolisation en composés peu actifs) (Hodek et al., 2002). Les flavanones et les flavanes sont peu influencées par les P450 en raison de leur structure non plane (Hodek et al., 2002).

#### **II.4.6.1. Activités antimicrobiennes :**

##### **II.4.6.1.1. Activité antibactérienne :**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes (Cushnie *et al.*, 2005). Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules (Cushnie *et al.*, 2005). Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétrine chez le cochon d'inde infectés par *Shigella*, sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium*) (Cushnie *et al.*, 2005).

De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008). Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus* sp., l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (Cushnie *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité (Cushnie *et al.*, 2005). Certains pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne (Cushnie *et al.*, 2005). La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-methylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase (Cushnie *et al.*, 2005)

- anti SAMR (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants) Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des MRSA (Botta *et al.*, 2009). Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve des meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' (sur le cycle B) et en 6 (cycle A). De plus, une hydroxylation en position 5 augmenterait l'activité. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait être mis en relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes (Botta *et al.*, 2009). De plus une dihydroxylation en méta, soit sur le cycle A soit sur le cycle B, augmente l'activité (Halbwirth, 2010).

Pour les flavanones, une étude indique qu'une 2',4' ou 2',6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5,7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR. Une substitution en position 6 ou 8 avec une longue chaîne aliphatique (type géranyle ou lavandulyle) augmente l'activité (Cushnie *et al.*, 2005).

- action sur les bactéries impliquées dans la formation des caries dentaires

L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) apparaît comme un agent intéressant pour la prévention des caries dentaires en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec l'incorporation du glucose, diminuant ainsi la synthèse d'acides organiques (Botta *et al.*, 2009).

- action sur *Helicobacter pylori*

Des roténoïdes prénylés ont montré une activité sur *H. pylori* par inhibition de l'oxydation de NADH de la chaîne respiratoire de la bactérie. La présence de carbones saturés en 6a et 12a semble indispensable à l'activité, de plus le cycle E doit être un cycle à 6 (Botta *et al.*, 2009 ; Takashima *et al.*, 2002). Des isoflavonoïdes de la réglisse ont également une action sur *H. pylori* (Botta *et al.*, 2009 ; Morel , 2011)

#### **II.4.6.1.2. Activité antifongique :**

De nombreux flavonoides possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que l'activité des ptérocarpanes soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la présence de substituants oxygénés en position 3 et 9 apparaît comme essentielle à l'activité (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Morel 2011)

#### **II.4.6.1.3. Activité antivirale :**

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7-triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés (Andres *et al.*, 2009). La génistéine pourrait être active en inhibant la PTK (inhibition de l'entrée du virus), en inhibant la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de l'assemblage du virus), en inhibant la sécrétion du facteur TNF- $\alpha$ , ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (inhibition de la réplication virale) (Andres *et al.*, 2009).



Des isoflavanones ainsi que des isoflavonoïdes prénylés ont une activité antivirale sur le VIH, des études suggèrent qu'une absence de groupement hydroxyle en position 4' et une absence de tout substituant en position 5 est nécessaire à l'activité (Botta *et al.*, 2009).

Des flavones (baicaléine, robustaflavone, hinokiflavone) sont décrites comme inhibant la reverse transcriptase du VIH-1, d'autres (gardénine A, 3,2'-dihydroxyflavone) inhibent la protéinase de VIH-1, l'intégrase de VIH-1 ou la transcription virale (Cushnie *et al.*, 2005). Dans une étude concernant 34 flavonoïdes naturels ou de synthèse, la chrysin apparaît comme la molécule présentant le meilleur index thérapeutique contre VIH-1 (Cushnie *et al.*, 2005).

Plusieurs mécanismes d'actions sont proposés, incluant une inhibition de la polymérase virale, un attachement à l'acide nucléique viral ou aux protéines de la capsid virale (Cushnie *et al.*, 2005 ; Morel, 2011)

#### **II.4.6.2. Activités antiparasitaires :**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antiparasitaires. Les plantes contenant des roténoïdes, dont en particulier la roténone, ont longtemps été utilisées pour lutter contre les ecto et les endo-parasites. D'ailleurs des formulations vétérinaires existent.

La roténone représente ainsi le principe actif (0,1 à 10%) de quelques formulations acaricides à usage externe pour les chats, les chiens, les ruminants et les porcs.(Morel, 2011)

#### **II.4.7. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires :**

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène.

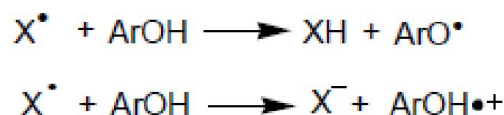
L'activité anti-radicalaire peut être évaluée par radiolyse pulsée, par l'étude spectrométrique du piégeage de radicaux colorés tel que le 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•+). L'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Une méthode alternative consiste aussi à déterminer leur aptitude à diminuer la réaction de peroxydation des lipides.

#### **• Mécanismes d'action :**

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont été décrits :

**- Le piégeage direct des radicaux libres :**

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés (X) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène :



Le radical aryloxyde formé est stabilisé par résonance. L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique. Mais, il peut continuer à évoluer selon plusieurs processus (dimérisation, dismutation, recombinaison avec d'autres radicaux, réduction en molécule parent, oxydation en quinone) soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules.

L'activité antiradicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes .

**- Chélation des ions métalliques (Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>+</sup>) :**

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives.

Par ailleurs, la complexation des flavonoïdes par des métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation.

**- Inhibition d'enzyme :**

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monoxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase...).

**- Régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' $\alpha$ -tocopherol .**

**• Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes :**

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (Van acker, 1996), (Sroka, 2005), (Aliaga, 2004). Il s'agit de :

**- Présence d'une fonction catéchol sur le cycle B :**

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité

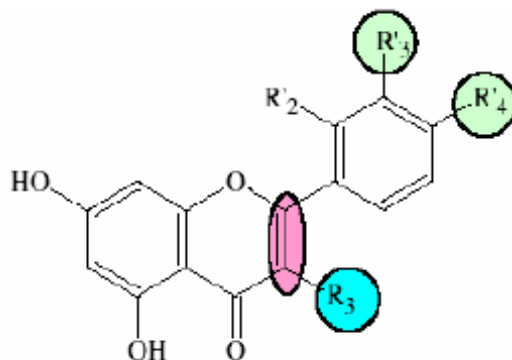
résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

**-Présence d'un motif énone dans le cycle C :**

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

**- Présence de groupement hydroxyle en position 3 :**

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones .



**Figure9 :** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

D'autre part, plus le degré d'hydroxylation du flavonoïde est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé. De même, la polymérisation de flavonoïde peut améliorer, comme dans le cas des polymères de rutine ou des procyanidines , ou conserver les activités antiradicalaires.

En ce qui concerne l'effet de l'acylation sur les propriétés antioxydantes, il a été principalement rapporté pour les esters galliques de la famille des flavanes ainsi que pour les esters de rutine et d'acide succinique. Dans ce dernier cas, l'auteur a montré que les modifications de la partie osidique de la rutine n'altéraient pas le pouvoir antioxydant sauf dans les cas d'une succinylation élevée. (Perrier *et al.* , 1998) et (Boumendjel *et al.*,2003) ont revendiqué la conservation de l'activité antioxydante des esters d'hésperitine et d'acide dodécandioïque. De même,( Saija *et al.* ,2003) ont observé que l'acylation de la quercétine sur

le groupe hydroxyle en position 3 avec différentes chaînes aliphatiques (acétate, propionate, palmitate) ne masque pas l'activité de piégeage de radicaux libres de la molécule parent.

Récemment, (Mellou *et al.*, 2005) ont observé que les dérivés acylés de la chrysoeriol-7-O-β-D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside et de la chrysoeriol-7-[6''-O-acetyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glycopyranoside] ont une activité antimicrobienne et antioxydante plus importante que les molécules parents. De même, (Katsoura *et al.*, 2006) ont constaté une augmentation de l'activité antioxydante avec la rutine-4''-O-oléate.

En fonction du mécanisme de l'activité antiradicalaire étudiée, quelques différences dans les relations structure-activité ont été observées. Le tableau I.3 résume l'effet des éléments structuraux des flavonoïdes sur les activités antiradicalaires, de complexation des métaux et d'inhibition de la peroxydation des lipides. (chebli.L, 2006)

#### **II.4.8. Inhibiteur enzymatique :**

L'inhibition des enzymes par les flavonoïdes concerne plusieurs classes. Il s'agit des hydrolases, les oxydoréductases, ADN synthétases, ARN polymérase, phosphatases, protéine kinases, oxygénases, amino acide oxydases. Dans le cas des oxygénases, plusieurs mécanismes d'inhibition ont été proposés :

- Le piégeage des radicaux libres générés au cours du mécanisme réactionnel de l'enzyme (l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes)
- Le flavonoïde peut remplacer le co-facteur et empêcher son recyclage en raison de leur analogie structurale
- La complexation de Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> par les flavonoïdes. Ces ions métalliques sont essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme.

A fin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, (Sadik *et al.*, 2003) ont étudié l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxygénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe<sup>2+</sup>, mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy).

L'effet de la nature du flavonoïde, en termes de degrés d'oxydation du cycle C, du nombre d'hydroxyle et de leur alkylation, de la présence d'une structure catéchole et de substituants a aussi été étudié sur l'activité de ces molécules (63-65). Comme pour l'activité antioxydante, les éléments structuraux améliorent l'activité d'inhibition du flavonoïde. Les substituants ont par contre des effets variables. En effet, la glycosylation diminue

drastiquement l'activité inhibitrice alors que la présence de groupes alkyles en position C6 ou C8 semble l'améliorer. (chebli, 2006)

### II.5. Les Coumarines :

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorota* Wild., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine, d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford et al., 2001).

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : *Légumineuse*, *Rutacées*, *Apiécées* et *Thymeleacées*. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (Hofmann, 2003), Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann, 2003).

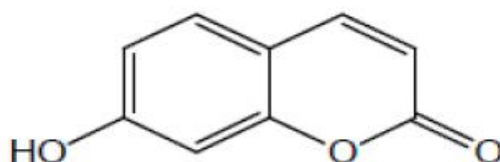


Figure10 : Structure des coumarines

### II.6. Les Tanins :

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (Bruneton, 1999). Cette

propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith, (1973) c'est que les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (Brunet, 2008).

Les tannins se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former un précipité.

### **II.7. Les Terpènes :**

Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « *Pistacia Terebinthus* » (Ayad, 2008).

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaïssa, 2011).

L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Malecky, 2005).

### **II.8. Les alcaloïdes :**

Le terme «alcaloïde» a été introduit par W. Meisner au début du XIX<sup>ème</sup>. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910. Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga; 2011).

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Ainsi, la nicotine, produite dans les racines, migre vers les feuilles où elle est diméthylée. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Krief, 2003). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (Mauro, 2006).

Le plus souvent, la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de site précis (racine en croissance, cellules spécialisées de laticifères, chloroplastes) ; ils sont ensuite transporté dans leur site de stockage. (Rakotonanahary, 2012).

## Matériel et méthode

### Partie II : MATERIELS ET METHODES

Dans cette partie nous avons essayé de séparer les composés phénoliques que pourrait contenir une espèce végétale connue pour leur utilisation en phytothérapie nous avons d'abord procéder à une extraction puis à une analyse qualitative de ces extrait ensuite nous avons essayé de tester une activité biologique antibactérienne sur ces extraits.

#### I. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de la mélisse officinalis qui ont été cueillies en mars 2017 de la région Constantine.

Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Le matériel végétal est broyé grossièrement dans un moulin électrique.



**Figure 11** : Les plantes utilisées de *Melissa officinalis*

#### II. Criblage des flavonoïdes

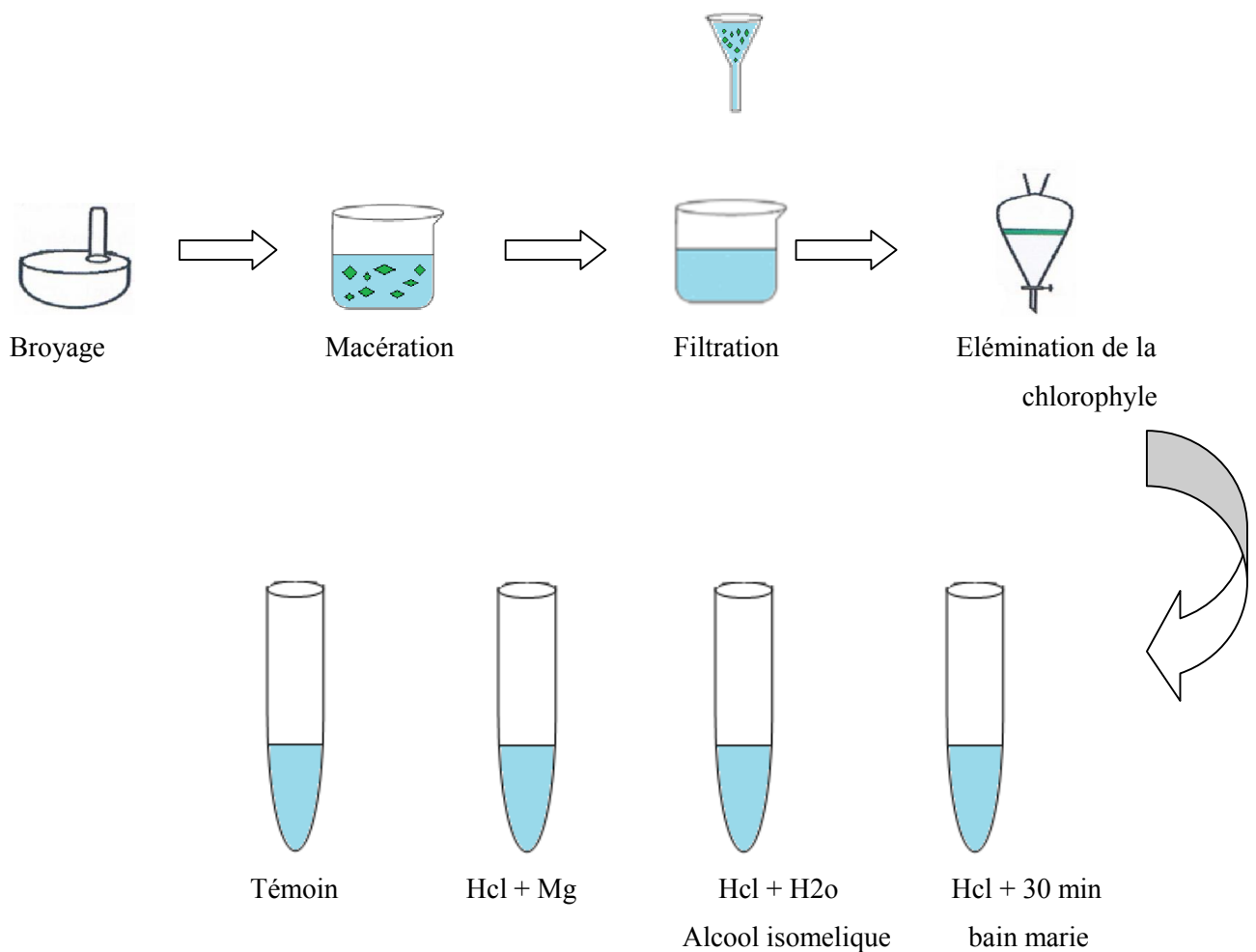
Les flavonoïdes représente une très large gamme de composé naturels appartenant à la famille des polyphénols, il sont considérés comme des pigment quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs des fruits et des feuilles (potet bénédicte, 2007).

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mis en évidence par des tests simple et rapides ( les réactions à cyanidine ). ( karumi et al., 2004).

## Matériel et méthode

Ce sont des tests pour voir s'il y a des flavonoïdes dans cette échantillon, à partir de 15g de matériel végétal mettre dans un bicher et ajouter 105 ml d'un mélange préparé de deux solvant (méthanol + l'eau distillé). Garder le rapport solvant/matériel végétale utilisé est : 10/1 (ml/l) pour le mélange du solvant on garde le rapport de volume 7/3 (v/v) 150 ml mélange : 105 ml méthénol 45 ml l'eau distillé.

On laisse le mélange pendant de 24 heures pour la macération après 24h on filtre le broyer a l'aide (papier filtre et entonnoir) l'extrait est réparti dans 4 tubes.



**Figure 12** : Protocole du screening phytochimique des flavonoïdes

Le tube (1) serve de témoin.

Dans le deuxième tube (2) on rajoute quelques gouttes de HCL concentré et quelque cristaux de Mg est on laisse agir 5 minutes. La coloration rouge impliqué la présence des flavone, coloration rouge pourpre impliqué la présence des flavanols et la coloration rouge violacée impliqué la présence des flavonones et flavanols.



## Matériel et méthode

Le troisième tube(3) on rajoute aussi à partir de l'extrait :(Quelque gouttes(5) de HCL + 1 ml de alcool isomérique + 1ml de H<sub>2</sub>O) C'est la coloration de la phase supérieur qui il prise en considération

On addition dans le quatrième tube (4) 0,5 ml du HCL concentré mette dans un bain marie pendant de 30 minutes à degré (80 -90 C°) de température. La coloration rouge dénoté la présence des leucoanthocyanes.

### **III. Extraction des flavonoïdes :**

#### **III.1. Macération et préparation des extrait méthanolique et éthanolique :**

L'extraction des flavonoïdes est basée sur leur solubilité dans les alcools (éthanol, méthanol) selon qu'il s'agit de matériel frais ou sec. Suivant le protocole d'extraction décrit par (Marston et Hostettmans, 2016 ; in AKroum 2011).

Les extrait ont été préparés par macération de la poudre du matériel végétal broyé à température ambiante dans un mélange de solvant pendant 24h par trois macération avec renouvellement de solvant et agitation de temps en temps.

Dans un mélange (méthanol /l'eau) 7/3 (V/V), le rapport solvant : matériel végétal utilisé était 10/1 (ml/g).

Et dans un mélange ( éthanol/l'eau) 7/3 (v/v) le rapport solvant : matériel végétal utilisé était 10/1 (ml/g).

#### **III.2. Préparation des extraits méthanoliques :**

Après la préparation de l'échantillon (feuilles) on mesure de 50g de matériel végétale (les feuilles de la mélisse) dans un balance.

Pour 50g de matériel végétal on ajoute 500ml de mélange (méthanol 350ml + l'eau distillé 150ml) agiter bien et laissé pendant 24h ,afin pour la premier macération.

Après la macération on a filtré et on récupère l'extrait N° 01 dans fiole.

Et on prépare le solvant de même mesure : 350ml méthanol et 150 l'eau distillée, et ajouter avec la matière végétal précédent, et laisser le deuxième macération elle est duré d'autre 24h.

Le même protocole expérimental dans deuxième et troisième macération est récupérer les extraits 2 et 3 donc on obtient à trois extraits à partir de la même matière végétale.

On mélange les trois extraits pour obtenir un extrait (1+2+3).Puis il y a une évaporation à sec en utilisant le l'évaporateur rotatif.

## Matériel et méthode

### III.3.Préparation des extraits éthanoliques :

Après la préparation de l'échantillon (feuilles) on mesure de 50g de matériel végétale (les feuilles de la mélisse) par une balance .

Pour 50g de matériel végétal on ajoute 500ml de mélange éthanol (350ml + l'eau distillée 150ml) agiter bien et laissé pendant 24h, afin pour la première macération. Après la macération on a filtré et on récupère l'extrait N° 01 dans fiole.

Et on prépare le solvant de même mesure :350ml éthanol et 150 l'eau distillé , et ajouter avec la matière végétal précédent, et laisser la deuxième macération elle est duré d'autre 24h.

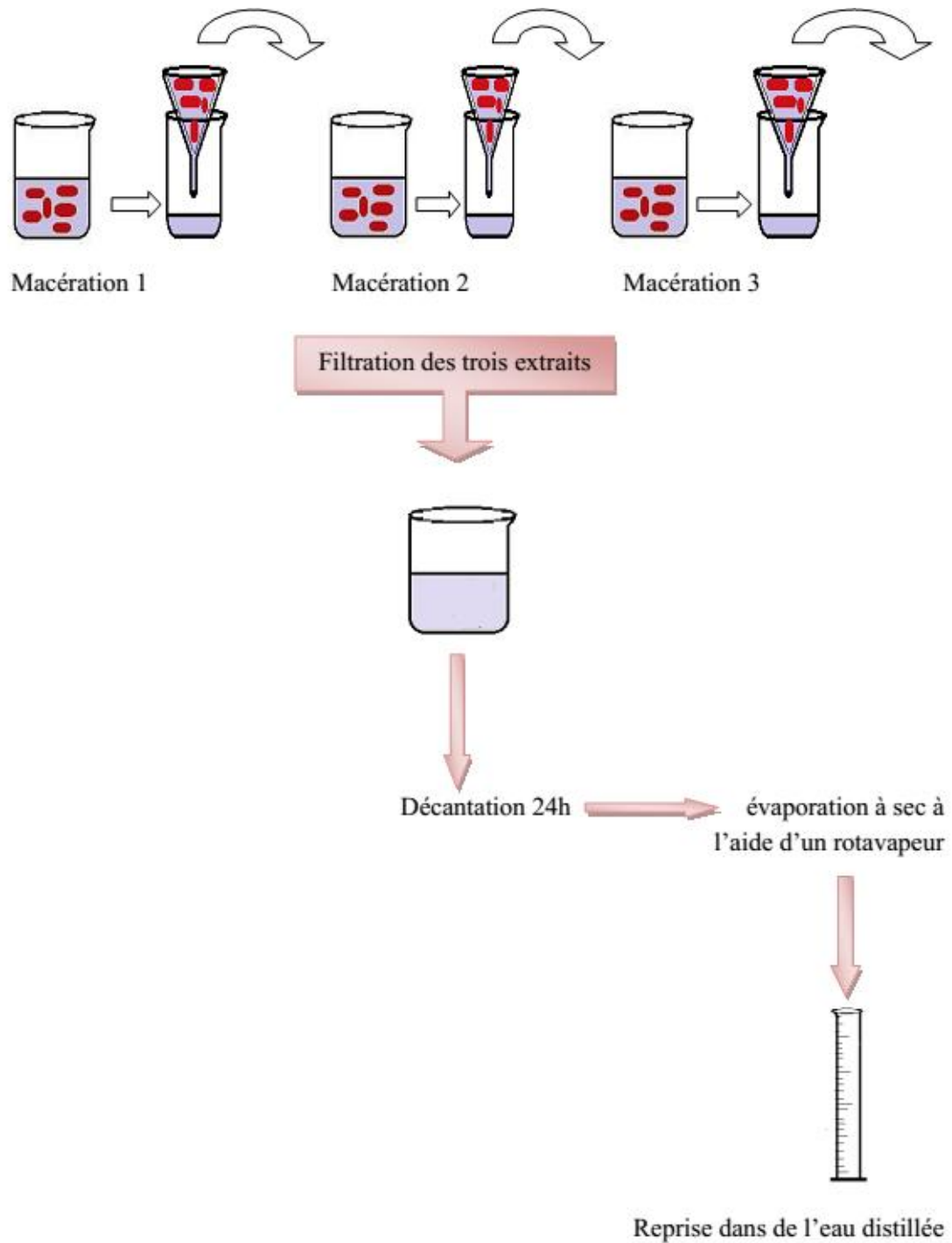
Le même protocole expérimental dans deuxième et troisième macération est récupérer les extraits 2 et 3 donc on obtient à trois extraits à partir de la même matière végétale.

On mélange les trois extraits pour obtenir un extrait (1+2+3). On fait une évaporation à sec par l'évaporateur rotatif.



**Figure 13 :** L'évaporateur rotatif

## Matériel et méthode



**Figure 14 :** Protocole de la préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques

### III.4. Fractionnement l'extrait méthanolique par extraction liquide-liquide (ELL) :

L'objectif de cette étape est d'identifier les flavonoïdes présents dans l'extrait méthanolique afin de déterminer la richesse de la plante en ces composés.

Pour l'affrontement on a utilisé des solvant de polarité croissante allant du moins polaire vers le plus polaire. l'extrait MeOH on été ramené à un volume 100ml dans Ether de pétrole, la même quantité du solvant a été utilisé ( 1/1 : v/v)

La phase aqueuse et le solvant (éther de pétrole) sont agités et laissés pendant 24h dans des ampoules à décanter. On jette la phase supérieure et on ajoute le même volume de la phase aqueuse par d'autre solvant (éther di éthylique). On agite et on laisse 24h.

Après 24h ; on récupère la couche supérieure, évaporées et reprises par 5 ml du méthanol.

On fait le même protocole avec les autres solvants (Acétate di éthyle, butanol) mais dans le dernier on récupère les deux phase (butanol, aqueuse), chaque phase évaporée est reprise par 5 ml de méthanol. L'extraction a été faite de la façon suivante :

- L'affrontement avec l'éther de pétrole levait les composé non phénolique (les acides gras, chlorophylle, huiles, résine ...) ; donc cette fraction est rejetée.

- L'affrontement avec l'éther di éthylique soutirait glycones.

- L'affrontement avec l'acétate d'éthyle soutirait les flavonoïdes mono glycolyses.

- L'affrontement avec le butanol soutirait le di-glycolyses et les tri-glycolyses.

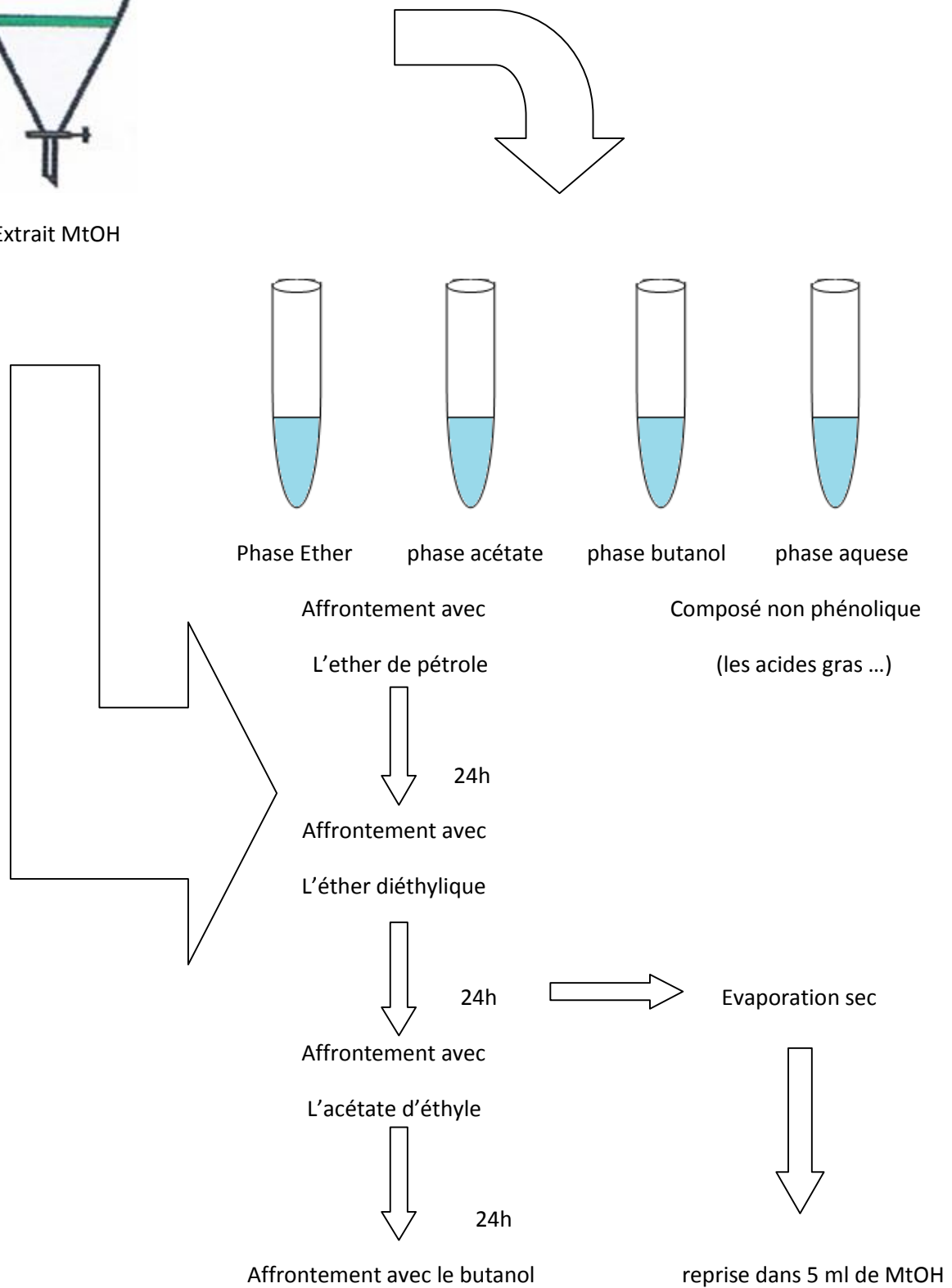
- L'affrontement avec la phase aqueuse restante contenait alors les flavonoïdes non soutirés (Merghem 1982,in Zeghad, 2008)

On été évaporé presque à sec dans un rota vapeur à 40°C, à une vitesse de 4 rotations/minute.

## Matériel et méthode



Extrait MtOH



**Figure 15 :** Protocole des fractionnements de l'extrait méthanolique par ELL

### **III.5.Fractionnement l'extrait éthanolique par extraction liquide- liquide (ELL) :**

L'objectif de cette étape est d'identifier les flavonoïdes présents dans l'extrait éthanolique afin de déterminer la richesse de la plante en ces composés.

Pour l'affrontement on a utilisé des solvant de polarité croissante allant du moins polaire vers le plus polaire. L'extrait EtOH on été ramené à un volume 100ml dans Ether de pétrole, la même quantité du solvant a été utilisé (1/1 : v/v)

La phase aqueuse et le solvant (éther de pétrole) sont agités et laissés pendant 24h dans des ampoules à décanter. jeter la phase supérieure et on ajoute le même volume de la phase aqueuse par d'autre solvant (éther di éthylique), agiter et laissé 24h ,

Après 24h ; on récupère la couche supérieure, évaporé et reprise par 5 ml du éthanol .

On faire le même protocole avec les autres solvants (Acétate di éthyle) mais dans le dernier on récupère les deux phase, chaque phase évaporé reprises par 5 ml de éthanol. L'extraction a été faite de la façon suivante :

- L'affrontement avec l'éther de pétrole enlevait les composé non phénolique (les acides gras, chlorophylle, huiles, résine ...) ; donc cette fraction est rejetée.

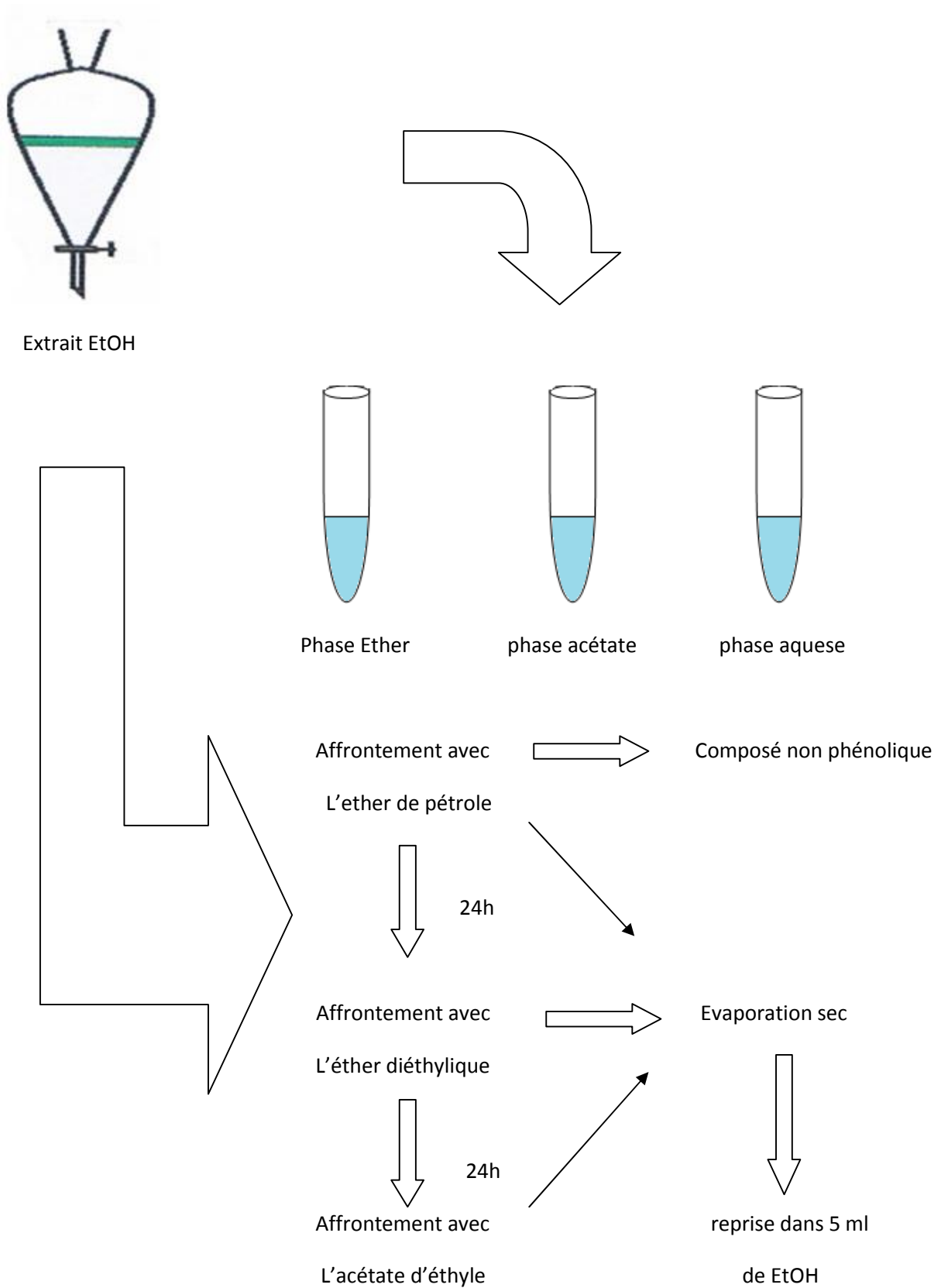
- L'affrontement avec l'éther di éthylique soutirait glycones.

- L'affrontement avec l'acétate d'éthyle soutirait les flavonoïdes mono glycolyses

- L'affrontement avec la phase aqueuse restante contenait alors les flavonoïdes non soutirés (Merghem, 1982, in Zeghad, 2008)

- Les fractions On été évaporées presque à sec dans un rota vapeur à 40°C, à une vitesse de 3 rotations/minute.

## Matériel et méthode



**Figure 16 :** Protocole des fractionnements de l'extrait éthanolique par ELL

### **IV. Séparation des flavonoïdes par la chromatographie sur couche mince (CCM) :**

La chromatographie sur couche mince est à la fois une méthode de séparation et d'identification de divers constituant d'un mélange (marouf,2002) la chromatographie sur une couche mince est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particule d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire ( Yrjonen, 2004).

C'est une méthode physique de séparation basée sur les différence d'affinités des substances à analyse l'égard de deux phase, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (éluant), selon la technique chromatographique mise en jeu.

La séparation des composants entraînés par la phase mobile est le résultat soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase (Marchal 1998).

La CCM est efficace, rapide et associe la sensibilité à la simplicité lorsque les conditions sont bien déterminées (wink, 1999)

#### **IV.1. Principe :**

Le principe repose sur des phénomène d'adsorption ou de partition, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou une feuille semi-rigide en verre ou aluminium. Une petite quantité de la solution à analyser est déposée sur le bord d'une plaque CCM. La plaque est ensuite trempée dans un éluant contenu dans une cuve fermée. L'éluant migre par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne les différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement.

Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur RF qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons.La migration des substances dépend essentiellement de leur polarité.

- Les polyhydroxyflavines ont des faibles valeurs de RF (0,00- 0,25)
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de RF comprises entre (0,3-0,5).
- Les flavonones, les flavonoles, méthoxyflavones, ont les valeur les plus élevées de RF (0,5- 0,75) (Bendyukova et Shinkarenko, 1973)

#### **IV. 1. Préparation de la phase mobile (l'éluant) :**

La phase mobile (éluant) est constituée par un mélange des solvants organique.

L'éluant est commencé avec des solvants peu polaire puis pour suivie par des solvants plus polaire (Gwenola *et al.*, 2011).



## Matériel et méthode

Système solvant	Butanol	Acide acétique	H2O
Proportion	4V	1V	5V

**Tableau1-** Composition en volume de la phase mobile utilisée en CCM

(Marston et Hostettmann, 2006)

Pour 1 cm de hauteur de l'éluant dans la cuve, on a préparé 150ml de l'éluant (60ml de butanol+ 15ml de l'acide acétique+ 75ml de H2O)

### **IV.2. Préparation de la phase stationnaire :**

On utilise comme phase fixe : le gel de silice, déposée en fine couche (couche mince) sur une plaque rigide (aluminium) , plaque préparé déjà (plaque commercial), à l'aide d'un crayon et règle, à partir de l'extrémité inférieure de papier chromatographique :on tracé une lignée très fine (de 2 cm) pour évité le grattage de couche de silice, est pour succès du processus de séparation . On dépose quelque points sur la ligne, également la même distance entre du deux points.

### **IV.3. La préparation de la cuve :**

- Cuve de nature de verre pour bonne observation.
- Couvercle de nature aussi (verre) pour éliminé l'évaporation des solvants pendant la séparation.

### **IV.4. Dépôts de l'échantillon :**

Le dépôt de l'échantillon sur la plaque , il est conseillé de tracer une ligne droit parallèle au bord inférieure et d'y placer les marque des futur dépôt, espèce d'un minimum de 0,5 cm le dépôt droit être effectué de façon homogène à l'aide d'un capillaire sans creuser le support solide

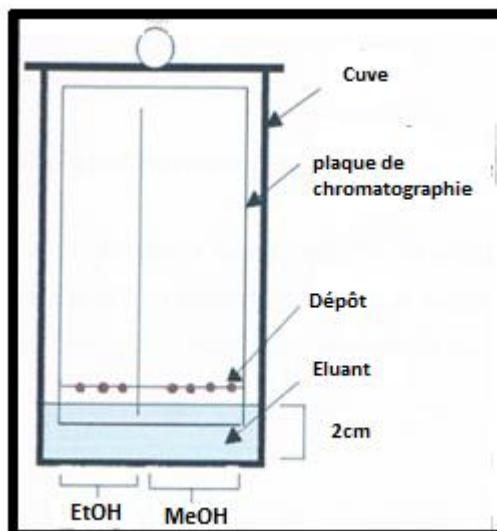
### **IV.5. Développement de la chromatographie :**

Pour les extrait méthanolique on a réalisé la séparation des phases suivant : Ether di éthylique , acétate d'éthyle ,butanol, et la phase aqueuse.

Pour les extraits éthanolique on a réalisé des phases suivantes : Ether di éthylique, acétate d'éthyle, phase aqueuse.

Après la saturation par la vapeur du solvant d'élution, la plaque est déposée en position légèrement inclinée dans la cuve chromatographique. On place la plaque et on la trempe dans du solvant approprié, chaque constituant de l'échantillon déposé migrent avec des vitesse différents.

## Matériel et méthode



**Figure 17 :** schéma de l'analyse CCM des flavonoïdes des extraits des feuilles de la mélisse

On retire la plaque de la cuve, le niveau du solvant est tracé par un trait fin (par crayon), puis la plaque est séchée à l'aide libre, marqué les taches saillants au sein de la plaque aussi avec d'un crayon.

### **IV.6. La révélation :**

Après migration et séchage, la visualisation des spots obtenus a été faite sous UV dans une chambre noire par la lampe UV.

### **V. Etude de l'activité antibactérienne :**

#### **V.1.Objectif :**

Pour évaluer l'activité antibactérienne des composés flavonoïdiques, la méthode de contact directe en milieu solide a été utilisée, les tests ont été réalisés sur deux bactéries, afin de déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à gram positif et des bactéries à gram négatif.

#### **V.2.Principe :**

L'activité antibactérienne des extraits est testé in vitro par la méthode de diffusion sur gélose (osato 2009, alam et mostahar,2005) Cette méthode a le même principe de celui de la réalisation d'antibiogramme. Le but est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotique dans une optique essentiellement thérapeutique (burnichon et texier, 2003) c'est-à-dire, l'application de patches imprégnés de principe actifs ou des puits remplies par le produit à testé sur des milieux de cultureensemencés de microorganisme.

## Matériel et méthode

L'activation inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits ou de disque, elle est considérée comme positive pour tout produit donnant un diamètre d'inhibition supérieure à 8mm (kabouss et al., 2000).

### V.3.Préparation de la souche bactérienne :

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de microbiologie à l'université de Constantine 1, il s'agit des espèces suivantes :

Nom	Classe
<i>Escherichia coli</i>	Gram négative
<i>staphylococcus</i>	Gram positive

Les deux espèces bactériennes sont ensemencées dans un bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 24h, pour optimiser leur croissance. Le bouillon nutritif c'est une suspension en solution saline 0,9% (sérum physiologique) ou bien l'eau physiologique stérile.

### V.4.Préparation du milieu de culture :

Les milieux de culture utilisés c'est la gélose nutritive probablement préparée au niveau du laboratoire (28g de gélose + 1L de l'eau distillée) on utilise 28g de gélose (poudre) et on ajoute 1L de l'eau distillée après on met le mélange dans un agitateur pendant 2 heures, puis on met dans le frigidaire pendant 24h. Après on met la gélose préparée dans l'autoclave pour la stérilisation pendant 2h, il devient liquide, ensuite on le coule dans des boîtes à pétrie stériles de 9 cm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est à 2mm répartie uniformément dans les boîtes. Puis on laisse sécher à une température ambiante du laboratoire près de bec benzène.

### V.5.Préparation des disques :

On prépare les disques de papier wattman N°4 de 4mm de diamètre, puis on les stérilise à 120°C pendant 20 min par autoclave. On utilise comme support chargé des extraits à tester à l'aide d'un capillaire, les disques imprégnés des extraits puis déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

### V.6. Culture des bactéries :

L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile. On a étalé la bactérie sur la surface du milieu de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

### V.7. Dépôt des extraits :

On a utilisé :

- A partir de l'extrait méthanolique des feuilles :
  - L'extrait Ether di Ethylique
  - L'extrait Acétate di éthyle

## Matériel et méthode

- L'extrait butanolique
- L'extrait de la phase aqueuse
- A partir de l'extrait éthanolique des feuilles :
  - L'extrait Ether di Ethylique
  - L'extrait Acétate di éthyle
  - L'extrait de la phase aqueuse

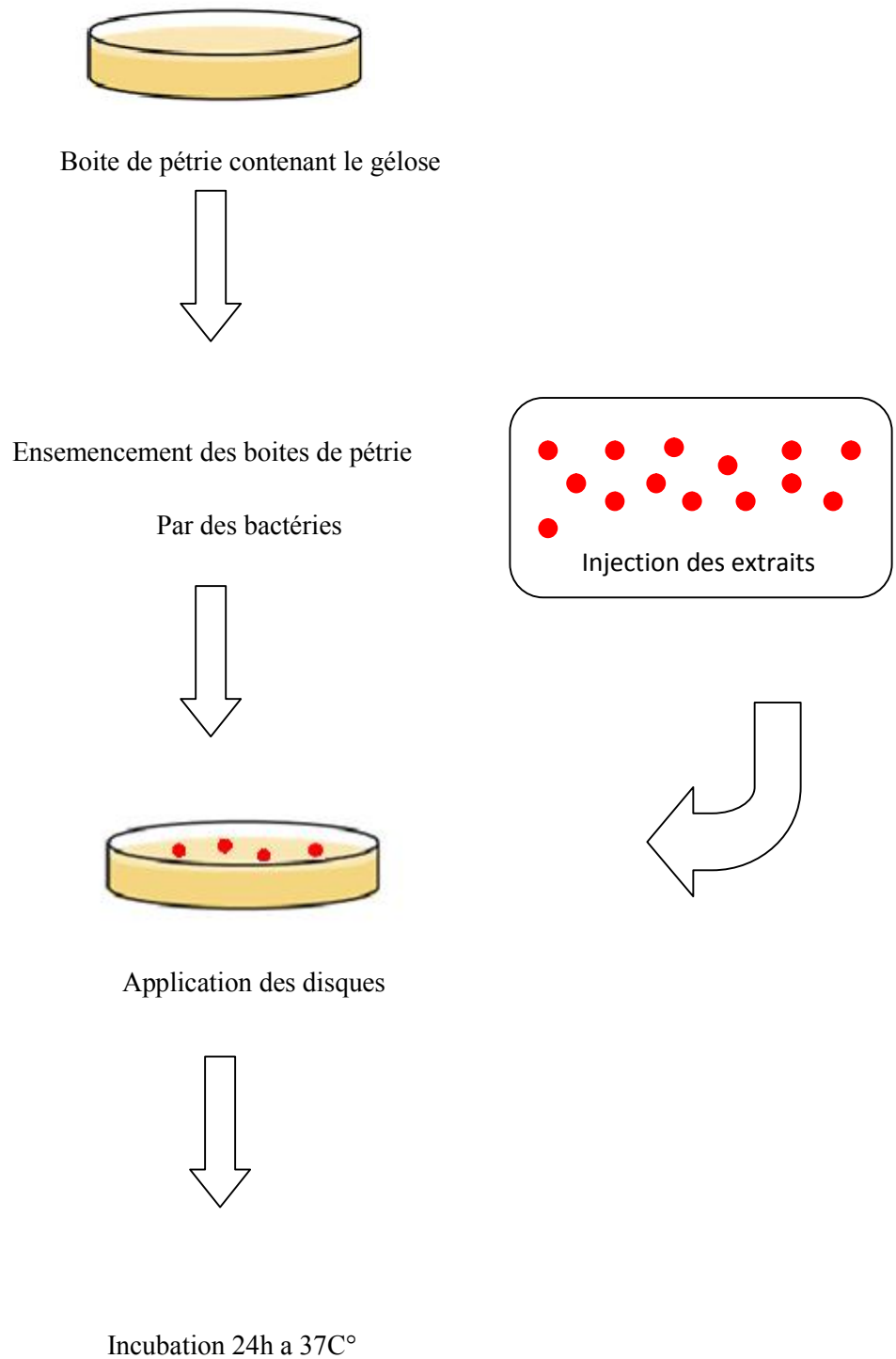
On injecte un volume de chaque extrait (les extrait méthanolique et les extraits éthanique) dans les disques à l'aide d'un capillaire, jusqu'à remplissage des disques.

On place les disques délicatement sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.

- **La concentration minimale bactéricide (CMB) :**

C'est un paramètre très important de l'activité antibactérienne. La concentration minimale bactéricide correspond à la concentration de l'extrait à partir de laquelle il y a une formation d'une zone d'inhibitrice.

## Matériel et méthode



**Figure 18** : Protocole du test de l'activité antibactérienne des extraits  
(Technique des disques)

## Résultats et discussion

### Partie III : RESULTATS ET DISCUSSION :

#### I. Criblage des flavonoïdes :

##### I.1. Résultats :

Le criblage phytochimique des flavonoïdes a donné des changements de coloration des extraits.

Test	Feuilles
Témoin	-
Test 1	+++
Test 2	+
Test 3	++

Réaction très positive : +++, Réaction positive : ++, Réaction moyenne positive : +, Test négatif :-

**Tableau2-** Résultats des tests de criblage des flavonoïdes



**Figure19 :** Les résultats du criblage des flavonoïdes des feuilles de *Melissa officinalis*

## Résultats et discussion

### **I.2. Discussion :**

Pour la détermination des flavonoïdes , nous avons réalisé le criblage phytochimique au niveau des feuilles de la plante ,ces tests révèlent la présence des flavonoïdes dans la plante la mélisse.

Selon les travaux de (Oka et al., 1998) et (Shieber et al 2005), les feuilles de la mélisse contiennent les différents composants du métabolisme secondaire, les flavonoïdes, les glycosides et les anthocyanine les alcaloïdes les tanin ..., dans notre travail cette présence est très marqué au iveau des feuilles .

Les flavonoïdes sont présents dans les feuilles sous deux forme : les flavonoïdes libre ( flavones : apparition de la couleur rouge) et les leucoanthocyanes.

Ces résultats sont comparés avec le premier tube (témoin).

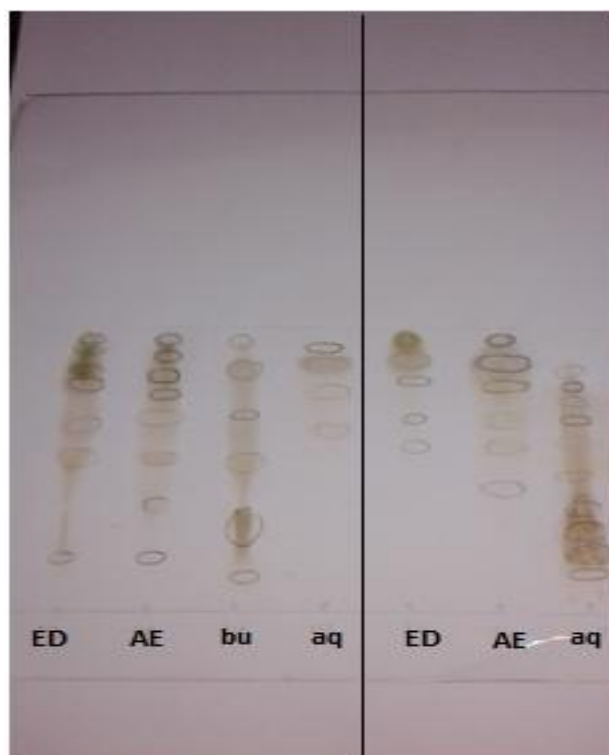
### **II. Séparation des extraits brute MeOH et EtOH par la chromatographie sur couche mince (CCM) :**

#### **II.1. Résultats :**

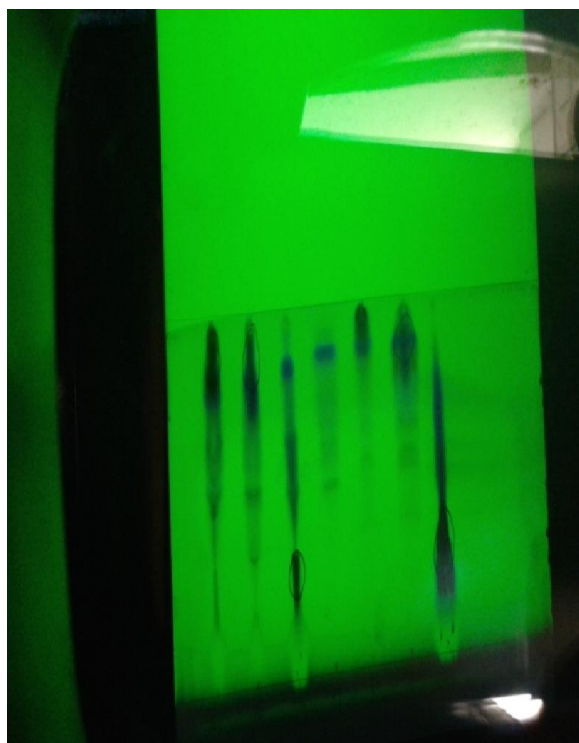
Le développement de la technique de la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire. La technique de développement choisie et de l'espace vapeur . ces facteurs ont un effet prononcé sur la séparation (yrjonen, 2004)

Pour avoir les empreintes flavonique de nos extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisé en utilisant le système solvant (butanol, acide acétique, eau distillée), les chromatogrammes résultants comportent une série de spot qui apparaissent sous lumière UV à 254nm, et à 365nm.

## Résultats et discussion



**Figure 20** : Chromatogramme des différent phases de nos extrait méthanolique et éthanolique .



**Figure 21** : Révélation par UV (250 nm) de nos extraits méthanolique et éthanolique



## Résultats et discussion

Spots révélés	Rapport frontal (RF)						
	Extrait MeOH				Extrait EtOH		
	Ph. ED	Ph. AE	Ph. Bu	Ph.aq	Ph. ED	Ph. AE	Ph.aq
Spot1	0,164	0,175	0,109	0,604	0,549	0,406	0,131
Spot 2	0,516	0,351	0,285	0,758	0,659	0,549	0,197
Spot3	0,637	0,591	0,494	0,857	0,791	0,648	0,263
Spot 4	0,791	0,659	0,885	0,923	0,879	0,769	0,340
Spot 5	0,835	0,747	0,659		0,945	0,868	0,450
Spot 6	0,91	0,813	0,736			0,946	0,505
Spot 7	0,945	0,890	0,780			0,946	0,505
Spot 8		0,946	0,890				0,571
Spot 9							0,659
Spot 10							0,725
Spot 11							0,780
Spot 12							0,824

**Tableau 3-** Les rapports frontaux des différents spots des extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de *Melissa officinalis*

**Ph. AE :** Phase Acétate d'éthyle

**Ph. ED:** Phase Ether di Ethylique

**Ph. Bu:** Phase Butanol

**Ph.aq:** Phase aqueuse

### II.2. Discussion :

D'après nos résultats et selon (Markham, 1982, in Akroum, 2011), le screening phytochimique réalisé dans notre travail confirme la richesse de la plante en flavonoïdes et aussi leur présence sous différentes formes, flavones et flavonols qui pourraient être sous forme aglycone, monoglycosylée, biglycosylée, triglycosylée.

Le chromatogramme obtenu dans notre travail montre des diminutions et des augmentations des valeurs de RF, pour différentes fraction Ether di éthylique, Acétate d'éthyle, butanol et aqueuse selon les deux extrais éthanolique et méthanolique.

## Résultats et discussion

Pour le RF de la phase aqueuse et acétate d'éthyle montrent des valeurs de RF élevées entre (0,5 – 0,75) il est riche en flavonoïdes. Approximativement sont flavonone, flavonol, méthoxyflavane, et donner un résultat optimal (majoritaire) par rapport aux autres fractions, selon (Bandyukova et Shinkarenko, 1973) cette augmentation est due à une méthylation des groupements (OH) et l'acétylation par contre la diminution des valeurs du RF (0,25) et (0,3-0,5) est expliquée, selon les mêmes auteurs, par l'augmentation des (OH) due principalement de l'introduction de nouveaux groupements de ces derniers (glycosylation), ces composés probablement sont : polyhydroxyflavones, oligohydroxy, oligométhoxyflavone.

### III. Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes :

#### III.1. Résultats :

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que *Staphylococcus* apparaît sensible vis-à-vis des extraits (flavonoïdes) testés, ces mêmes flavonoïdes développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis d'*Escherichia coli* dont les diamètres des zones d'inhibition sont présentés sur le tableau suivant :

Extraits	Phase	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)											
		<i>E. coli</i>			<i>Staphylococcus</i>			<i>E. coli</i>			<i>Staphylococcus</i>		
Extrait méthanolique	Ph .AE	/	/	/	2	/	/	1	/	/	3	/	/
	Ph .ED	3	1	2	5	3	2	3	2	1	5	3	2
	Ph .bu	/	/	/	5	3	/	/	/	/	5	/	/
	Ph .aq	4	3	3	2	2	1	3	2	/	5	3	/
Extrait éthanolique	Ph .AE	2	2	2	3	2	3	3	4	1	3	2	2
	Ph .ED	2	2	2	2	3	2	2	4	3	4	3	2
	Ph .aq	2	1	/	3	3	/	3	2	1	3	3	/

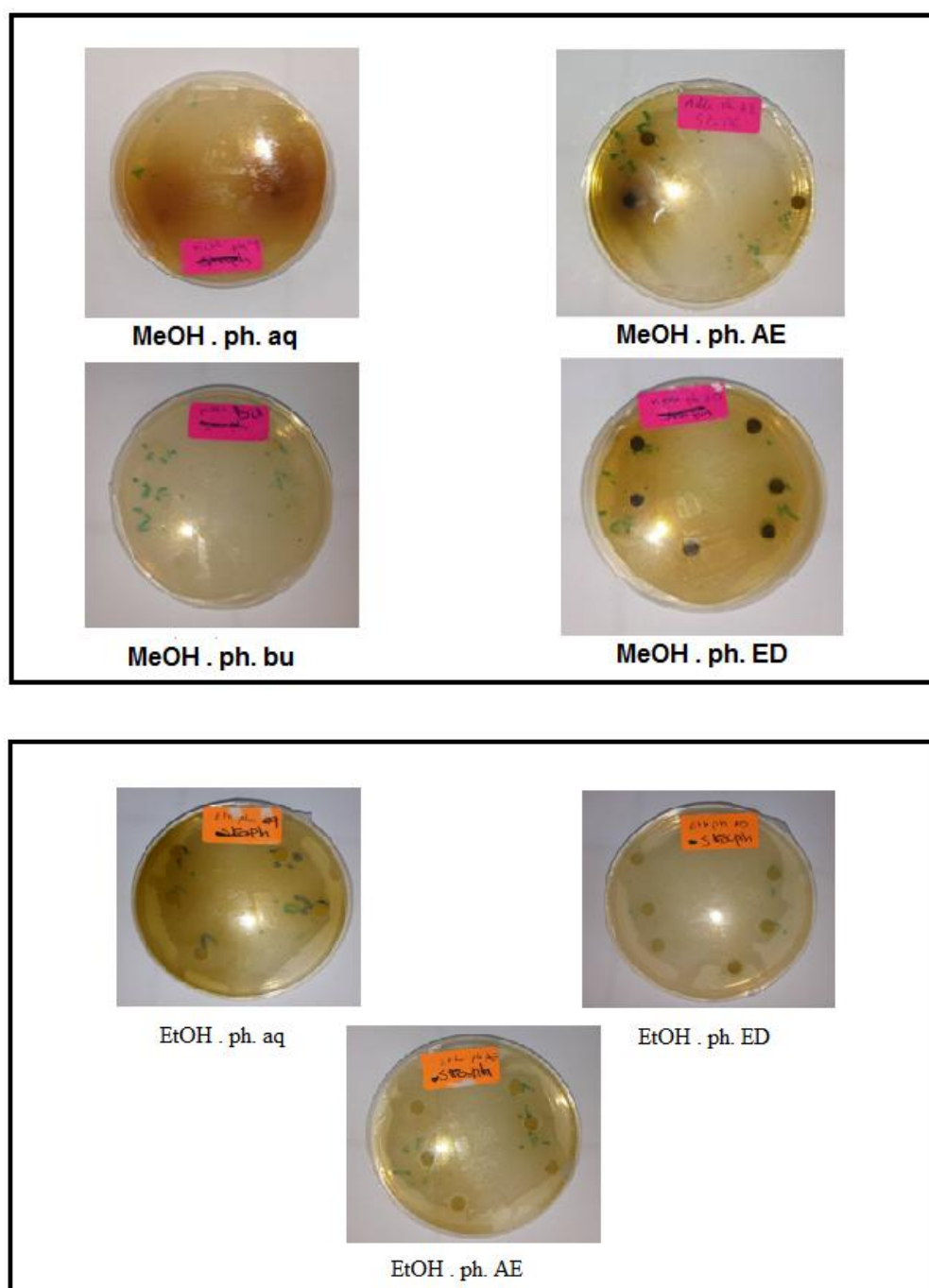
**Tableau 4 :** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavonoïques de *Melissa officinalis*.

**Ph. AE :** Phase Acétate d'éthyle

**Ph. ED:** Phase Ether di Ethylique

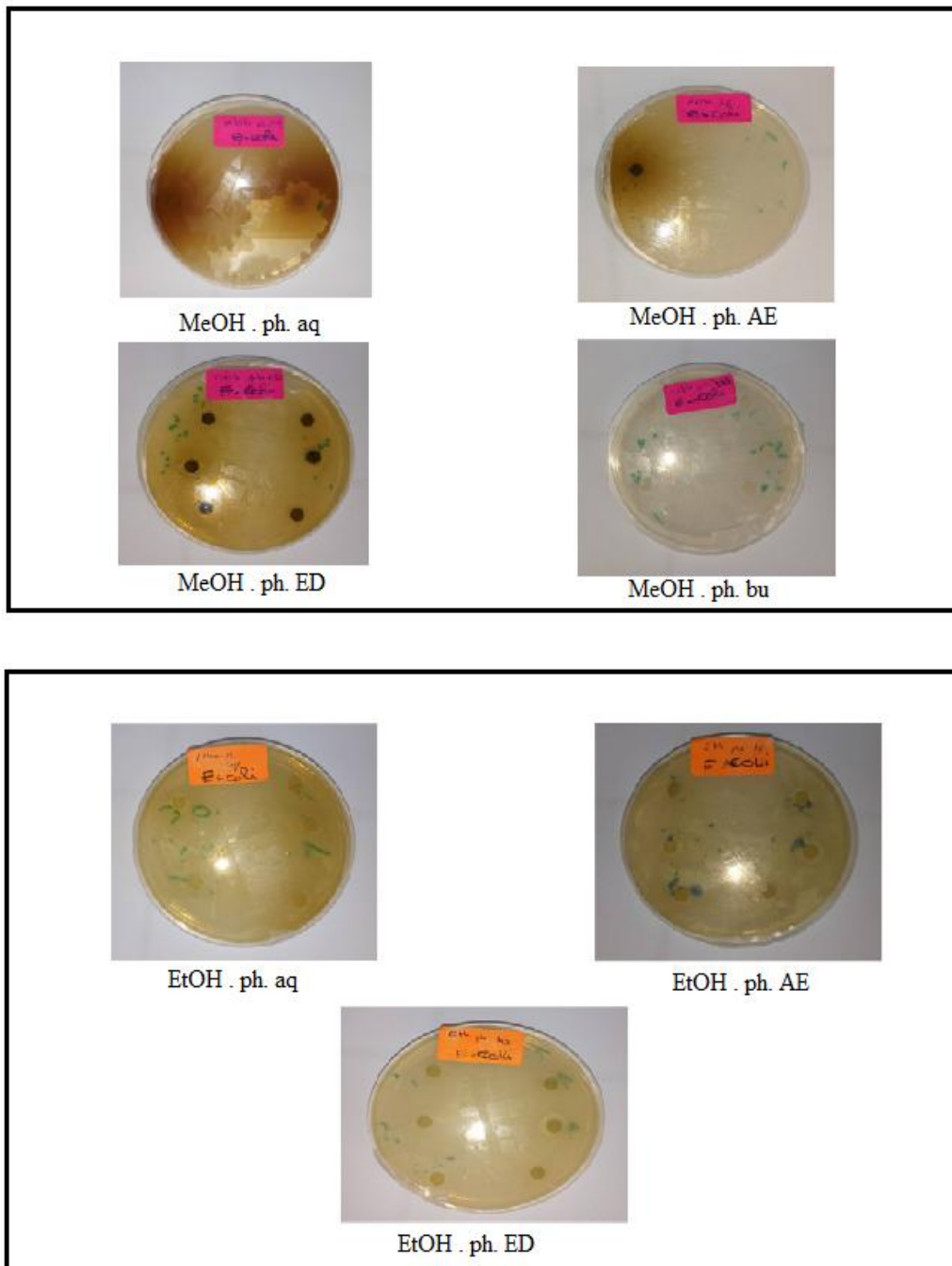
**Ph. Bu:** Phase Butanol

**Ph.aq:** Phase aqueuse



**Figure 22** : Résultats sur boîtes de Pétri de l'inhibition de *Staphylococcus* par les extraits flavonoïques de *Melissa officinalis*

## Résultats et discussion



**Figure 23** : Résultats sur boîtes de Pétri de l'inhibition de *E. coli* par les extraits flavonoïques de *Melissa officinalis*

### III.2. Discussion :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés de *Melissa officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Nutrient Agar). L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavoniques à tester vis-à-vis de deux germes pathogènes (*Escherichia coli*, et *Staphylococcus* ), après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C .

A partir de diamètre des zones d'inhibition on obtient un grand pouvoir antibactérien, les deux fractions acétate di éthyle et butanol sont très efficaces par rapport aux autres fractions éther di éthylique et aqueuse.

Selon le travail de (Kechkar, 2008) la phase acétate a donné également d'importantes zones d'inhibition. cette phase contient les flavonoïdes monoglycosylée et la phase éther diéthylique contient les aglycones.

La sensibilité des bactéries à gram négatif traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. On fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libre dont on constate que les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs.

D'après (pereia,S , 2006), la zone d'inhibition doit être égale ou supérieur à 10 mm.

Pour (Seokown et al., 2006), elle est supérieure à 6 mm, les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que *Staphylococcus* apparait sensible vis -à- vie des flavonoïdes qui développent des zones d'inhibition importantes.

Concernant *Eschrechia coli*, et selon les zones d'inhibitions, on constate que l'extrait brut éthanolique et méthanolique des feuilles a une activité antibactérienne importante car cet extraits a donné une forte inhibition.

## Conclusion

### **Conclusion :**

La phytothérapie est considérée comme une médecine douce, de nos jours, il existe plusieurs spécialités éventuellement combinées entre elles, qui utilisent les plantes à des fins médicinales. Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine.

Notre étude a concerné l'espèce *Melissa officinalis* qui appartient à la famille des Lamiacées. On a utilisé une plante originaire de la région de Constantine (Algérie). Notre recherche a pour but, la détermination de la richesse de la mélisse en métabolisme secondaire et plus précisément les flavonoïdes qui ont montré un potentiel antibactérien intéressant.

Ce travail a commencé par un criblage phytochimique qui révèle la présence des flavonoïdes au niveau de cette plante.

Le résultat de la chromatographie sur couche mince montre que les deux extraits méthanolique et éthanolique des feuilles contiennent plusieurs types de flavonoïdes.

L'activité antibactérienne des différentes fractions montre un pouvoir antibactérien contre les bactéries à gram positif et celles à gram négatif.

On conclut avec les résultats obtenus que notre espèce étudiée (*Melissa officinalis*) est riche en flavonoïdes qui présentent un pouvoir antibactérien très intéressant.

### **Perspectives :**

Comme perspective, notre étude peut nous orienter vers d'autres objectifs plus particuliers comme l'analyse de la nature chimique des flavonoïdes présents et de leur mode d'action.

La mélisse est riche en d'autres composés du métabolisme secondaire, notamment les terpènes, les alcaloïdes, tanin...ces derniers sont riches en molécule bioactives. Il est intéressant d'orienter des recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires et la détermination de ces nouvelles substances bioactives.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne il serait intéressant de tester le pouvoir d'inhibition sur d'autre espèce bactérienne et même sur des mycètes ou des virus. Il serait nécessaire de définir le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes et déterminer l'activité antioxydante, cette propriété et recherchée dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

## Références bibliographiques:

- Alam,S.et Mostahar,S ,(2005)** Studies of antimicrobial activity of two synthetic 2',4',6'-trioxygenated flavones.journal of applied sciences,P 327-333.
- Aliaga, C.; Lissi, A. E. (2004).** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. Can. J. Chem. 82, 1668-1673.
- Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S., et Hansen. (2000).** Content of phenolic acids dehydrodimersin 17 rye (*Secale Cereale L.*) varieties, J.Agric. Food Chem. p48, 2837, 2000.
- Andres A., Donovan S.M. and Kuhlenschmidt M.S. (2009).** ). Soy isoflavones and virus infections. Journal of Nutritional Biochemistry. 20: 563-569.
- Ayad, R. (2008).** recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine. p 35-39, 40, 47.
- BABA AISSA (1999).** ). Ency clopé die des plantes utiles : Flor d'Algérie et du Maghreb. Ed : librairie Modern rouiba ; p243 – 244
- Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia Smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.
- Bahorun, T. (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritis. p83-94.
- Balogh-Hergovich, E.; Speier, G. (2001).** Kinetics and Mechanism of the Base-Catalyzed Oxygenation of Flavonol in DMSO-H<sub>2</sub>O Solution. J. Org. Chem. 66, (24), 7974-7978.
- Barhacs, L.; Kaizer, J.; Speier, G. (2000).** Kinetics and Mechanism of the Oxygenation of Potassium Flavonolate. Evidence for an Electron Transfer Mechanism. J. Org. Chem. 65, (11), 3449-3452.
- Benaissa, O. (2011).** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.

**Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Del Bano, M., J.; Lorente, J. (2001).** Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem.* 49, (1), 189 - 191.

**Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E. (2004).** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* p50, 120-123.

**Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felingera, A. (2010).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias. p83-94.

**Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. (2009).** Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry.* 16: 3414-3468.

**Bouakaz, I., (2006).** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.

**Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Bresson-Rival, D.; Perrier, E. (2003).** Hesperitin Esters: Highly Stable Flavanones With Both Free Radical Scavenging and Anti-Elastase Activities. *Pharmaceutical Biology.* 41, (7), 546-549.

**Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.

**Bruneton, J. (1999).** Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Cannas A.* [www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos\\_effects.html](http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html) - 6k.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

**Calixto, (2005)** Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view *J. Ethnopharmacol.*, 100 (1–2) (2005), pp. 131–134

**chebli, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle, Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut national polytechnique de lorraine.



**Crozier A., Jaganath I.B. and Cliffor M.N. (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 26: 965-1096.

**Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343-356.

**Da Cunha, F.M *et al.*; (2004).** *Free Radic. Res.* p38, 1241

**Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L. (2003).** Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 80:65-70.

**Delporte. G., Mascolo. N., Izzo. A. A., *et al.*, (1999).** *Life. Scien.*, 65(4), 337-53.

**Djaaleb,S ,(2004)** etude quantitative et qualitative des composés phénolique chez trois variété du blé dur(tritium durum desf) soumises à un stress hydrique et leur activité antimicrobienne,mémoire de master ,université de Constantine1, P :13, 21, 22 ;24 .

**Dweek A.C. (2002)** Their chemistry and Effect on Skin and mucous Membranes. *Personal care magazine. Herbal Medicine for the Skin.*p : 19 ,21.

**Erlund. (2004).** *Nut. Res.* p24, 851-74.

**Fargeix, D. (2000).** Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoides en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoides. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon.

**Fleuriet, A. (1982).** Thèse Doc. Etat, Montpellier.

**Felingera, A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. p1217, 7972–7980.

**Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M. (2001).** The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, p39, 153-162.

**Fouché,J.G, Marquet, A.et Hambuckers,A. (2000)** Les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observation du monde des plantes.

**Friedman, M.; Jurgens, H. S. (2000).** Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, (6), 2101-2110.

**Glombitza, K. W. & Gerstberger, G. (1985).** *Phytochemistry* (Elsevier) p24, 543-551.

**Goodwin, T. W., & Editor (1988).** *Plant Pigments*.

**Grayer R.J. and Harborne J.B. (1994).** A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 37: 19-42.

**Guignard, J.L. (1998).** *Abrégé de botanique*. Masson (Ed). Paris, 212p.

**Hahn, D. H., Faubion, J.M., and Rooney, L.W. (1983).** Sorghom phenolic acids, their high performance chromatography separation and their relation to fungal resistance. *Cereal Chem.* 60: 255. In: *Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits*. Dykes, L; Rooney, W.L. 2007. Texas A&M University. CFW-52-3-0105.

**Halbwirth H. (2010).** The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 595-621.

**Harborne, J.B., (1980).** *Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology*, New series.p8, 329-402.

**Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. p68, 2831–2846.

**Havsteen, B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* p96, 67– 202.

**Hodek P., Trefil P. and Stiborova M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologicaly active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 139: 1-21.

**Hoffman, L. (2003).** *Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes*. Thèse de doctorat. Strasbourg. 245p.

**Ishihara, K.; Nakajima, N. (2003).** Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 23, (2-6), 411-417.

**Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I. (2008).** Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*. 7: 125-154.

**KAR (2007)** . pharma-cognosy and pharma-biothechnology : Ed : Neuc AGE International publishers, p: 1 – 30

**Karumi,Onyeyili , P.A. et Ogugbuaja, V.O.(2004).** Identification of active principals ok *M.balsamia* (Balsam Appele) Leaf Extract. P : 179- 182.

**Katsoura, M. H.; Polydera, A. C.; Tsironis, L.; Tselepis, A. D.; Stamatis, H. (2006).** Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof.

**Kawada *et al.*,( 2001)** the Japanese Society for Psoriasis Research has conducted an annual survey of psoriasis patients in Japan from 1982 to 2001.

**Kechkar,M. (2007)** mémoire de magistère.

**Kim, K. H., Tsao, R and Cui, S. W. (2006).** Phenolic acid profile and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect hydrolysis conditions. *Food Chem.* p95, 466, 2006.

**Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p

**Laraoui, H. (2007).** "Etude Phytchimique L'Extrait Chloroformique de *BupleurumAtlanticum*" Docteur de l'université Louis pasteur (Chimie Organique, UV El Hadj Lakhdar Batna).

**Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005).** Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* p53, 1990-1995.

**Maillard, M. N., (1996).** Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris. 148p.

**Makris, D. P.; Rossiter, J. T. (2002).** An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry*. 77, (2), 177-185.

**Malecky, M. (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.

**Manallah, A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.

**Markham, (1982)** Techniques of flavonoid identification.

**Mauro, N. M. (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.

**Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H. (2005)** Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116, (3), 295-304.

**Mochizuki, M.; Yamazaki, S.-i.; Kano, K.; Ikeda, T. (2002).** Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1569, (1-3), 35-44.

**Mohammedi, Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. mémoire magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 155p.

**Morel. (2011).** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). *Biochimie, Biologie Moléculaire*. Université d'Angers, Français.

**Mrouf, A. (2002) .** Analyse instrumentale a l'usage des biologistes p : 17-24.

**Newman, D.J. , Cragg, G.M. et Snadern, K.M.(2000)** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report*. P :215-234.

**Nkhili, Ez-zohra. (2004).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité: Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier. 378p.

**Oka,N.,Ikegami, A., Ohki,M.,Sakata,K.,Yagi,A. et Watanabe,N (1998)** Citronelly disaccharide glycoside as an aroma precursor from rose flowers. *Phytochemistry* .p : 1527 -1529.

**Osato ,M.,(2009)** Comparison of the Etest and the NCCLS- approved agar dilution method to detecte metronidazole and clarithromycin resistant Helicobacter pylori.J.antimicrob.Agents.p :39-44.

**Pereira ,S. (2006)** anti-microbial activity of indigofera suffruticosa.

**Perrier, E.; Mariotte, A. M.; Boumendjel, A.; Bresson-Rival, D. (1998).** Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmetique, dermopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. FR2778663-A1.

**Porter, L. J. (1989).** Methods in Plant Biochemistry. p1, 389-419.

**Rakotonanahary, M. (2012).**

thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.

**Ramos-Tejada, M. M.; Duran, J. D. G.; Ontiveros-Ortega, A.; Espinosa-Jimenez, M.; Perea-Carpio, R.; Chibowski, E. (2002).** Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 24, (3-4), 297-308.

**Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. (2007).** Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. Food Chem. Toxicol. p45, 328-336.

**Sadik, C. D.; Sies, H.; Schewe, T. (2003).** Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. Biochemical Pharmacology 2003, 65, (5), 773-781.

**Saidman, E.; Yurquina, A.; Rudyk, R.; Molina, M. A. A.; Ferretti, F. H. (2002).** A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 585, (1-3), 1-13.

**Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Luisa Pellegrino, M.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F. P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F. (2003).** 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new

quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 56, (2), 167-174.

**Sakai, M.; Suzuki, M.; Nanjo, F.; Hara, Y. (1994).** 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP0618203.

**Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. (2005).** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. p45, 287–306.

**Seokwon, K. (2006)** antibacterial and antifungal activity of sulfurcontaining compounds from *Petiveria alliacea*.

**Shieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollow, P. et Carle, R. (2005)** Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. p :379-384.

**Smith, D. S.; & Kramer, J. R. (1999).** *Environment International*. p25, 295-306.

**Smith, G.; Thomsen, S.; Markham, K.; Andary, C.; Cardon, D. (2000).** The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry*. 136, 87-91.

**Sroka, Z. (2005).** Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C*. 60, (11-12), 833-843.

**Suba, A., Muralikrishna, G. (2002).** Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet. *J. Agric. Food Chem.* 50:889, 2002. In *Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits*: Dykes, L; Rooney, L W. 2007. Texas A&M university college station TX. PDF.

**Svehlikova, V.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A.; Bao, Y. (2004).** Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*. 65,(16), 2323-2332.

**SVOBODA (2000)** . . Secretory structure of aromatic and medicinal plants. Ed 6 : Springer p: 397 – 439

**Takashima J., Chiba N., Yoneda K. and Ohsaki A. (2002).** Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plant and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. *Journal of Natural Products*. 65: 611-613.

**Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P. (2004).** Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]- cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35, (2), 379-387.

**Theuscher et al, (2005)** plante aromatique : epice, arpmate, condimantes et huiles essentielles éditions TEC & DOC (300-303).

**Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D.-j.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, (3), 331-342.

**Wink,M.(1999)** Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology .CRC Press . IL.SI North America flavonoids workshop. *Journal of Nutrition*.

**Yrjonen,T. (2004)** Extraction and planar chromatographie separation techniques in the analysis of natiral products,faculty of pharmacy of the university of Helsinki.p :64.

**Zeghad,,N ( 2008)** Etude de contenu polyphénolique de deux plante médicinale d'intérêt économique (Mémoire magistère) versité Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.

**Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S & Blanchard, C. (2004).** The distribution of phenolic acids in rice. *Food chem*.87:401.2004. In *Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits* .Dykes, L; Rooney, L .W. 2007. Texas A&M university college station TX. PDF.

**Zhu, Q. Y.; Holt, R. R.; Lazarus, S. A.; Ensunsa, J. L.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. (2002).** Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *J. Agric. Food Chem*. 50, (6), 1700-1705.

## **Les sites :**

<http://www.guide-phytosante.org/calmant-sedatif/melisse/>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lamiaceae>

[https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/107992/tab/taxo](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/107992/tab/taxo)

<http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/contents/2254-melisse-bienfaits-pour-la-sante>

[http://www.leboncomplement.com/melisse/#Effets\\_secondaires\\_et\\_contre-indication](http://www.leboncomplement.com/melisse/#Effets_secondaires_et_contre-indication)

<http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/melisse.htm#proprietes-medicinales-de-la-melisse>