

---

Soumis le : 12 Avril 2013  
 Forme révisée acceptée le : 16 Avril 2014  
 Email de l'auteur correspondant :  
**feknous.souad@yahoo.fr**

---

## Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.)

Souad FEKNOUS<sup>(\*)</sup>, Fairouz SAIDI<sup>(\*)</sup>, Ramdhane MOHAMED SAID<sup>(\*)</sup>,

(\*) Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie.

---

### Résumé

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques relatifs à une plante à caractère thérapeutique « *Melissa officinalis* L. ».

L'aspect macroscopique de la plante a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermique sur la tige, les feuilles, le pétiole et le calice et la corolle des fleurs.

Des coupes microscopiques au niveau des tiges, feuilles et pétioles par la technique de double coloration (vert de méthyle-rouge Congo) ont révélé la présence de structures sécrétrices superficielles (poils épidermiques à tête vésiculaire).

L'extraction de l'huile essentielle de la plante, accomplie par le procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau avant la floraison, a donné un rendement de 0,17%.

L'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse nous a permis de connaître la composition qualitative de l'huile essentielle de la plante (citral, oxyde de caryophyllène, bergamotène et citronellyl acétate).

L'extraction des composés non volatils par le soxhlet a donné 10,86% des composés apolaires et 37,17% des composés polaires.

L'extraction de certains principes actifs par la macération a permis de quantifier une teneur de 7.6% de tanins et 0.6% d'hétérosides flavoniques, conférant ainsi à cette plante différentes propriétés thérapeutiques.

*Mots-Clés* : *Melissa officinalis* L. ; plantes médicinales ; huile essentielle ; métabolites secondaires.

### 1. Introduction

Les feuilles alimentées en éléments simples (eau, sels minéraux, oligo-éléments) et, recevant l'énergie du soleil, synthétisent un ensemble de molécules organiques très complexes qui sont des agents des vertus médicinales du monde végétal [2].

A l'instar d'autres contrées du monde, l'Algérie possède aussi ses "jardins splendides" avec ses plantes vertueuses et la médecine traditionnelle, ainsi pratiquée, trouve un accueil favorable auprès des populations qui sont, hélas, parfois en proie à un charlatanisme ignorant et dangereux pour les malades [11]. Il est important de s'assurer de l'innocuité d'une plante, de connaître ses possibilités et ses limites et de savoir dans quelles conditions on peut l'utiliser [6].

*M. officinalis* est une vieille plante mellifère, condimentaire et médicinale, importée par les Romains et les anciens Grecs [3]. Les apiculteurs des abords de la méditerranée avaient l'habitude d'en enduire les ruches afin que les abeilles ouvrières ne s'éloignent pas de leur demeure [4]. Elle sert de remède médicinal depuis plus de 2000 ans [13]. En Algérie, la mélisse est cultivée dans les régions de la Kabylie. Néanmoins, elle est spontanée dans les montagnes du Tell, où elle est signalée comme assez rare jusqu'en 1962. On l'observe dans les ravins humides des montagnes de Babors, du Djurdjura et de l'Atlas Blidéen, les décombres, les endroits frais et les forêts, ainsi qu'aux alentours des maisons [1];[8];[11];[7].

La mélisse (famille des lamiacées) est une plante herbacée touffue (Figure 1.1), robuste et vivace, à rhizome court [17].

Elle est aromatique et très parfumée. Elle dégage une odeur agréable de citron caractéristique, obtenue par simple froissement des feuilles [18];[1];[20].

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques relatifs à cette plante poussant sur le sol algérien et très préconisée par les herboristes pour son action calmante et antispasmodique.

En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de notre recherche, notamment les constituants naturels tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles (HE).

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel végétal

La partie aérienne (tige-feuilles) de la mélisse a été récoltée avant la floraison durant le mois de mai 2009 dans la localité de Hammam Melouane (wilaya de Blida – Algérie).

Le séchage de la plante a été effectué naturellement à l'abri de la lumière et de l'humidité sur du papier durant 15 jours (Fig.1).

L'identification de la plante a été faite au niveau du Parc National de Chréa (direction de Blida) ainsi qu'au laboratoire de botanique du département d'agronomie à l'université Saad Dahlab de Blida.

### 2.2. Coupes histologiques

Pour chercher des spécificités morphologiques et anatomiques de la plante et localiser éventuellement les sites sécréteurs des essences aromatiques, des coupes histologiques microscopiques au niveau des feuilles, tiges et pétioles de la plante ont été accomplies par la technique de la double coloration (vert de méthyle - rouge Congo) [16] et ce en parallèle avec des observations macroscopiques.

### 2.3. Étude des composés volatils

#### 2.3.1. Extraction de l'huile essentielle de mélisse:

L'extraction de l'HE de mélisse a été faite par entraînement à la vapeur d'eau suivie d'une détermination du rendement.

Il s'agit d'une distillation continue en circuit fermé pendant un temps suffisant pour entraîner la totalité de l'huile essentielle contenue dans la plante. Les vapeurs en traversant la plante font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmonte l'eau dans l'ampoule de décantation (Fig.2).

Pour la récupération de l'HE de la phase aqueuse de l'hydrolat nous avons procédé à la séparation liquide-

liquide avec un solvant organique, éther diéthylique, sélectionné pour son affinité vis-à-vis des HE.

Après la décantation (Fig.3), la phase organique est récupérée et débarrassée de toutes traces d'eau par du sulfate de magnésium anhydre. L'utilisation d'un évaporateur rotatif permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'HE.



Fig.1: Séchage de *Melissa officinalis* L.



Fig.2: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.



Fig.3: La décantation.

#### 2.3.2. Analyse chromatographique de l'HE :

Conditions opératoires de la Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM) :

Le protocole utilisé dans cette étape est celui adopté au laboratoire central de la police scientifique et technique d'Alger.

L'analyse chromatographique de l'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse type Hewlett-Packard (6890N) couplé à un spectromètre de masse (HP 5973N) d'Agilent.

La fragmentation est effectuée en mode électron-impact (E.I.) à 70eV, voltage de multiplicateur 1500 à 2000 V.

La CG est muni d'un injecteur Split, d'une colonne en silice fondue remplie d'une phase stationnaire HP-1 (méthylsilicone). Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml / min.

La séparation chromatographique est faite sur une colonne HP-5 (30 m x 0,32 mm. D x 0,25 µm film thickness). La température de la colonne est programmée de 37 à 250 °C à raison de 2 °C.min<sup>-1</sup>

L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée.

#### 2.4. Étude des composés non volatils polaires et apolaires

##### 2.4.1. Extraction au soxhlet

La poudre de la plante (40g) est introduite dans la cartouche en papier filtre, cette dernière sera placée dans le soxhlet surmonté d'un réfrigérant (Fig.4).

L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute [12];[19].

En premier lieu, verser 500 ml d'éther de pétrole dans le ballon et porté à ébullition. Après une douzaine de siphonages, le solvant s'enrichit en substances solubles. Une concentration avec un évaporateur rotatif permet l'obtention de la fraction lipidique.

Le marc dégraissé par l'éther de pétrole est repris par le méthanol selon le même protocole pour la récupération de la fraction polaire.

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions.

##### 2.4.2. Analyse des fractions polaire et apolaire par spectrophotomètre UV-visible

Dans les composés, chaque fonction absorbe la lumière à une longueur d'onde bien déterminée, appartenant au domaine UV-visible [15].

Dans notre étude, cette technique a été utilisée pour déterminer la présence de groupements fonctionnels actifs des concrètes et confirmer ainsi la réussite de l'extraction.

Les deux fractions apolaire (par l'éther de pétrole) et polaire (par le méthanol) sont reprises dans quelques ml

du solvant approprié et sont soumises à un balayage en spectrophotométrie entre 220 et 800 nm.



Fig.4: Montage Soxhlet.

#### 2.5. Extraction de certains principes actifs de mélisse

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante [15];[12]. Nous avons effectué l'extraction des tanins et flavonoïdes de *Melissa officinalis* de cette manière.

##### 2.5.1. Extraction et détermination de la teneur en tanins

30 g de poudre végétale a été dégraissée en les laissant macérer dans 100 ml d'éther de pétrole pendant 24 h. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés.

Le marc récupéré est repris par 50 ml d'éther diéthylique ensuite il sera filtré pour éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique.

Le marc est repris une deuxième fois par 100 ml de méthanol. Il est filtré dans un ballon préalablement pesé.

Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous vide pour obtenir un résidu sec. C'est un extrait pur de tanins qui sera pesé [9].

##### 2.5.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes

Une quantité de 30 g de poudre végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 72 h. Après filtration, le méthanol est évaporé par un évaporateur rotatif à une température de 60 °C sous vide. Le résidu sec obtenu est traité par 50 ml d'eau tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

Nous avons mis en oeuvre une série d'extraction liquide-liquide dans des ampoules à décanter par des solvants non miscibles à l'extrait aqueux.

Cette opération permet la séparation d'un ou de plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non miscibles.

Elle consiste en l'addition de 3x30 ml de chloroforme qui élimine la chlorophylle et les lipides. Ensuite, nous ajoutons 3x30 ml de l'éther diéthylique pour extraire les génines et les flavonoïdes libres. Enfin, l'addition de 3x30 ml d'acétate d'éthyle permet d'éliminer les monosides et entraîne la majorité des hétérosides flavoniques. Au cours de ces différentes étapes, nous récupérons la phase aqueuse.

Au cours de la dernière phase aqueuse, nous ajoutons 3x30 ml de butanol pour récupérer la phase alcoolique.

Cette dernière phase contenant les flavonoïdes est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Elle est ensuite soumise à une évaporation du butanol sous vide à 55 °C pour l'obtention du résidu sec. C'est l'extrait des flavonoïdes qui sera pesé.

### 3. Résultats et Discussion

#### 3.1. Observations microscopiques des structures sécrétrices

Cette étude a permis de localiser les sites sécréteurs des essences végétales. L'observation morphologique des tiges, feuilles, pétiole, le calice et la corolle des fleurs sous loupe binoculaire a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermiques.

A l'échelle microscopique, les coupes histologiques réalisées dans les organes étudiés montrent l'absence de cellules sécrétrices, de poches sécrétrices ou de canaux excréteurs.

Les coupes transversales au niveau des tiges font apparaître la présence 2 types de poils : les poils sécréteurs à tête vésiculaires responsables de la sécrétion de l'HE ainsi que les poils protecteurs pluricellulaires (Fig. 5)

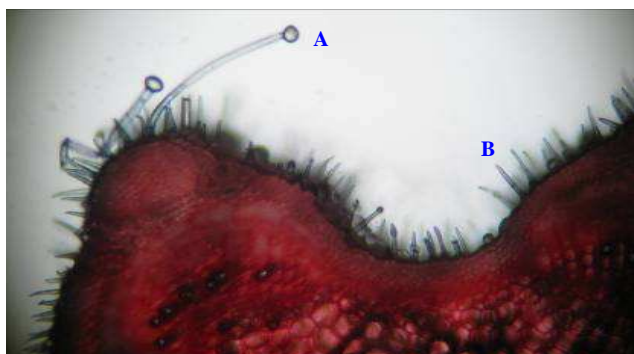


Fig.5: Observation microscopique des poils au niveau de la tige (Gx 40) : (A) Poils sécréteurs à tête vésiculaires; (B) Poils protecteurs.

#### 3.2. Extraction et rendement en huile essentielle

Par entraînement à la vapeur d'eau de la plante séchée, nous avons obtenu comme représenté le tableau 1, un rendement moyen de 0,17 % en huile essentielle.

Tableau 1: Résultats de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

Poids de la plante (moyenne en g ± écart type)	Poids de l'HE (moyenne en g ± écart type)	Rendement (% ± écart type)
792,8259 ± 75,9605	1,3780 ± 0,0767	0,1747 ± 0,0126

Ce rendement peut varier d'une part, d'une région à une autre, selon les facteurs pédoclimatiques, et d'autre part selon l'équipement d'extraction.

L'HE obtenue est un liquide de couleur jaune foncée avec une odeur très forte, citronnée et très agréable. Les caractères organoleptiques de l'HE de *Melissa officinalis* sont très appréciés en parfumerie.

#### 3.3. Composition chimique de l'HE :

L'analyse de l'HE de *Melissa officinalis* par CG-MS, nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la figure 6.

##### Interprétation du chromatogramme:

Le chromatogramme issu de l'analyse de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. comporte quatre pics nécessaires. Chaque pic a été soumis à une analyse par spectrophotométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

Le pic n°1 correspond au spectre de masse du néral ou citral b, qui est le terpène responsable de l'odeur de la mélisse.

Le pic n°2, le plus important, correspond au spectre de masse de (-)-oxyde de caryophyllène, appartenant à la famille des oxydes terpéniques. Selon ANTON, R. et WICHTL, M, ce composé est le résultat de la transformation de  $\beta$ -caryophyllène en époxyde de caryophyllène durant la conservation de la plante [5]. C'est un stéréoisomère de l'époxyde de caryophyllène.

Le pic n°3 correspond au spectre de masse de bergamotène, qui appartient à la famille des sesquiterpènes.

Le pic n°4 correspond au spectre de masse de l'acétate de citronellyl, qui est un ester.

Le détail de la composition chimique des molécules est représenté dans le tableau 2.

Ces constituants majoritaires qui caractérisent cette HE peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres notamment les conditions de stockage ainsi que l'équipement et le mode d'extraction.

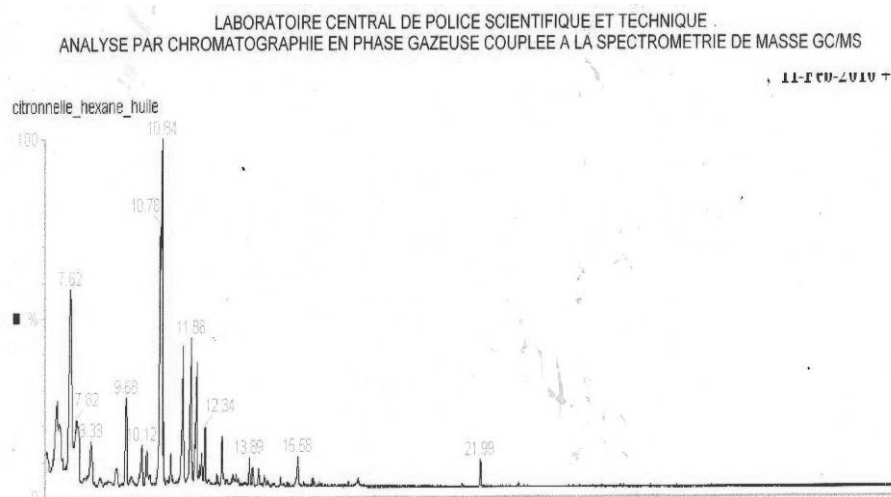


Fig. 6: Chromatogramme de la fraction volatile de *Melissa officinalis* L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG-MS

Tableau 2: Composition chimique de l'HE de *Melissa officinalis* L.

Temps de rétention (min)	Composés majoritaires	Formule brute	Structure chimique
7,62	Néral (Citral b)	$C_{10}H_{16}O$	
10,84	(-)- oxyde de caryophyllène	$C_{15}H_{24}O$	
11,86	Bergamotène	$C_{15}H_{24}$	
13,88	Citronellyl acétate	$C_{12}H_{22}O_2$	

Tableau 3: Résultats de l'extraction des composés apolaires et polaires.

	Poids de la poudre (moyenne en g ± écart type)	Poids de la concrète (moyenne en g ± écart type)	Pourcentage (% ± écart type)
Composés apolaires	40,0100 ± 0,0031	4,3452 ± 0,2704	10,8602 ± 0,6750
Composés polaires		14,8708 ± 0,6210	37,1675 ± 1,5493



### 3.4. Étude des composés non volatils polaires et apolaires :

#### 3.4.1. Extraction au soxhlet :

L'extraction à l'aide du soxhlet, a permis d'obtenir 10,86 % des composés apolaires et les composés polaires représentent 37,17 % du poids de la poudre de la mélisse comme est représenté dans le tableau 3.

#### 3.4.2. Analyse des fractions polaire et apolaire par spectrophotomètre UV-visible :

Un balayage a été effectué entre 220 nm et 800 nm afin de vérifier la présence de métabolites. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 7 et 8.

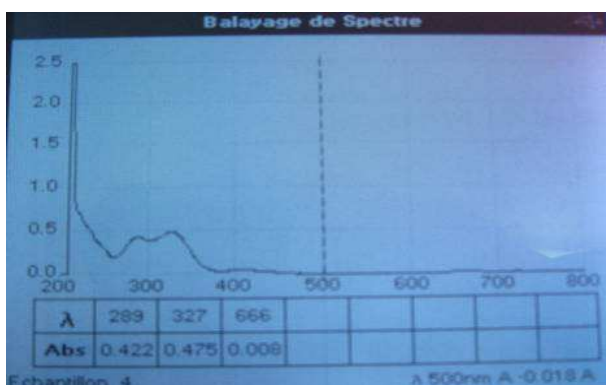


Fig.7: Spectre UV-visible de l'extrait apolaire de *Melissa officinalis* L.

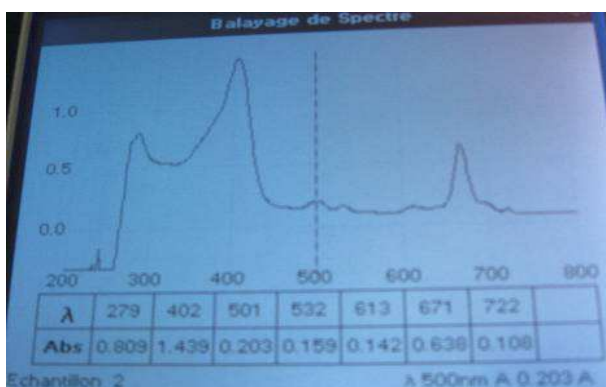


Fig.8: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de *Melissa officinalis* L.

On observe les différents pics d'absorption en fonction de la longueur d'onde et de l'absorbance pour chaque fraction confirmant ainsi l'efficacité de l'extraction.

Selon LAFONT [14], le domaine d'absorption situé entre 291 nm et 300 nm est propre aux composés benzéniques, alors que le domaine entre 400 nm et 498 nm est caractéristique aux caroténoïdes et dérivés. Celui entre 600 nm et 664 nm correspond à la chlorophylle.

#### ➤ La fraction apolaire:

Nous pouvons remarquer la présence de 03 pics à 03 longueurs d'ondes différentes, avec une absorbance élevée entre 250 nm et 350 nm. Cette absorption peut être expliquée par la présence de composés benzéniques.

#### ➤ La fraction polaire:

Nous pouvons remarquer la présence de 07 pics à 07 longueurs d'ondes différentes, ce qui signifie la présence de molécules actives au niveau de cet extrait alcoolique. L'absorption à 402 nm et à 671 nm correspond respectivement à la richesse en caroténoïdes et chlorophylle.

L'analyse des deux concrètes de *Melissa officinalis*, révèle que la fraction polaire est très riche en métabolites secondaires ce qui lui confère différentes propriétés thérapeutiques.

### 3.5. Extraction de certains principes actifs de mélisse :

#### 3.5.1. Extraction et détermination de la teneur en tanins :

Le résultat de la teneur en tanins obtenue de la poudre de mélisse montre que cette plante est très riche en tanins, avec un taux de 7,5983%, donnant à cette plante les différentes propriétés thérapeutiques [10].

Cette teneur correspond principalement à l'acide rosmarinique tel qu'il est précisé par Anton [5] et Teuscher [17].

#### 3.5.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes :

Nous constatons d'après le résultat de la teneur en flavonoïdes de la poudre que *Melissa officinalis* contient 0,6360% de flavonoïdes.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Teuscher [17]. En effet, selon Teuscher [17], la teneur en flavonoïdes est comprise entre 0,2 % et 0,7 % chez la mélisse.

## 4. Conclusion

La science moderne, en étudiant et analysant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer leur valeur mais, elle veut préciser, comparer et classer leurs diverses propriétés quelles soient bénéfiques ou non. Cette étude a pour but de grouper les plantes à effets similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître et éviter celles qui sont toxiques pour l'homme.

Le présent travail avait pour objectif de déterminer la composition chimique de *Melissa officinalis* L., très utilisée en Algérie, et d'en connaître éventuellement le ou les principes actifs lui conférant des propriétés thérapeutiques. L'utilisation des procédés d'extraction tel que l'entraînement à la vapeur d'eau et le soxhlet a permis de séparer et de quantifier les molécules volatiles et non volatiles. Ainsi, nous avons obtenu un rendement moyen de 0,17 % en huile essentielle à propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie.

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse est une technique fine qui a permis d'identifier la composition chimique de *Melissa officinalis* L. En effet, elle a permis d'identifier la composition moléculaire de l'extrait volatil de la plante qui est composé essentiellement de terpène, oxyde terpénique, sesquiterpène et d'ester.

L'extraction séparément des principaux composés actifs nous a permis d'en déterminer la teneur dans la plante. Elle est de 7,6 % pour les tanins et 0.6 % pour les hétérosides flavoniques.

L'ensemble des résultats obtenus in vitro constitue une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Dans le domaine de génie génétique, il serait intéressant d'étudier la possibilité d'exploiter cette plante pour la production de nouveaux antibiotiques. Des études complémentaires in vivo seraient nécessaires pour évaluer les effets de la mélisse.

## 5. Références

- [1] Aït Youssef M., "Plantes médicinales de Kabylie", Editions Ibis Press, Paris, (2006), 349p.
- [2] Albouy, V., "Le jardin médicinal, pas à pas : soignez-vous avec les produits de votre jardin", Editions de la Lesse, Aix-en-Provence, France, (2008), 95p.
- [3] Andreas, B., "Guide des plantes du bassin méditerranéen", édition Française, Les éditions Eugen Ulmer, (1998), 400p.
- [4] Anne-Sophie et Nogaret-Ehrhart, "La phytothérapie – se soigner par les plantes", Edition Groupe Eyrolles, (2003), Deuxième tirage 2006, 191p.
- [5] Anton, R. et Wichtl, M., "Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique", 2<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, (2003), 692p.
- [6] Baba Aïssa, F., "Les plantes médicinales en Algérie", Coédition Bouchène et Ad. Diwan, Alger, (1991), 97 p.
- [7] Baba Aïssa, F., "Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb", copyright librairie, Alger, (1999), 368 p.
- [8] Beloued, A., "Plantes médicinales d'Algérie", Edition office des publications universitaires, (09-2005), 284p.
- [9] Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", Tec et doc édition Lavoisier, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, (1999), 1120p.
- [10] Charpentier, B., Hamon-Lorléac'H, F., Harlay, A., Huard, A. et Ridoux, L., "Guide du préparateur en pharmacie", Edition Masson, Paris, (1998), 1242 p.
- [11] Delille L., "Les plantes médicinales d'Algérie", Berti éditions, Alger, (2007), 240p.
- [12] Djabou, N., "Sambucus nigra L., une plante de la pharmacopée traditionnelle du nord africaine", Thèse de magister en chimie organique appliquée, Faculté des Sciences - Département de Chimie, université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, (2006), 123p.
- [13] Grünwald J. et Jänicke C., "Le guide de la phytothérapie", Edition Marabout, (2006), 416p.
- [14] Lafont, R., "Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules", (2005), "<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>"
- [15] Lagnika, L., "Etude phytochimique et activité biologique des substances naturelles isolées de plantes Béninoises", Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, université Louis Pasteur Strasbourg, (2005), 268p.
- [16] PRAT R. « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations ». Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris 2007, 56 p.
- [17] Teuscher, E., Anton R. et Lobstein A., "Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles", (2005), 522p.
- [18] Quezel P. et Santa S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", Edition Centre National de la Recherche Scientifique, France, Paris, Tome 2, 7<sup>ème</sup> édition, (1963), 595 p.
- [19] William, B.J., "The original of the soxhlet extractor", Journal of Chemical Education, Volume 84, n°12, Canada, (2007), pp 1913.
- [20] [http://www.herbalpedia.com/lemon\\_balm-hoy\\_profile.pdf](http://www.herbalpedia.com/lemon_balm-hoy_profile.pdf).