



UNIVERSITÉ MOHAMMED V

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT

Année : 2015

Thèse N° : 08/15 CSVS

Centre d'Études Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé

Formation : Sciences du Médicament

THÈSE DE DOCTORAT NATIONAL

Présentée par:

Amina BOUNIHI

Soutenue le : 06/01/2016

**Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation
Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*
(Lamiacées)**

JURY

Professeur Yahia CHERRAH	Faculté de Médecine et de Pharmacie-Rabat Université Mohammed V	Président
Professeur Amina ZELLOU	Faculté de Médecine et de Pharmacie-Rabat Université Mohammed V	Directeur de thèse
Professeur Katim ALAOUI	Faculté de Médecine et de Pharmacie-Rabat Université Mohammed V	Rapporteur
Professeur Abdelaziz BENJOUAD	Université Internationale-Rabat	Rapporteur
Professeur Abdelkhalk OUSSAMA	Faculté des Sciences et Techniques-Beni-Mellal Université Sultan Moulay Slimane	Rapporteur
Professeur Abdelali BOULI	Faculté des Sciences et Techniques-Beni-Mellal Université Sultan Moulay Slimane	Examineur
Professeur Mina AIT EL CADI	Faculté de Médecine et de Pharmacie-Rabat Université Mohammed V	Examineur

Dédicace



Louange à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

On dit « les mots s'envolent, seuls les écrits restent » c'est pour cela que je vous écris ces petits mots.

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde :

À mes très chers parents,

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec toute ma tendresse.

À mon cher époux Youssef BAALI,

Je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon égard. Les paroles m'échappent, tout simplement un grand merci pour votre grand amour, votre patience, vos encouragements et vos services. Merci pour la chaleur humaine que vous m'apportez au quotidien.

À mes chers sœurs Inaam et Aafaf et ma petite fille Rim,

Qui me font oublier tous mes soucis avec leurs douces paroles et leur charmant sourire enfantin. Merci pour votre amour sans limite.

À toute la Famille.

Merci pour vos conseils, votre soutien, vos encouragements et surtout vos bénédictions et votre amour.

À tous mes professeurs,

Spéciale dédicace à toutes mes amies.

À tous ceux qui me sont chers.



Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir donné le courage et la patience à réaliser ce travail.

La première personne à qui je souhaite adresser mes chaleureux remerciements, Mme le professeur **Amina ZELLOU**, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et Directrice de ma thèse d'avoir acceptée de diriger ce travail. Elle m'a guidé tout au long de son élaboration, elle a effectuée de multiples relectures patientes de mes écrits et a mis à ma disposition un certain nombre d'ouvrages Pharmacologiques. C'est grâce à ses suggestions, remarques et critiques que ce travail a pu être effectué et sans elle ce travail ne pourra avoir lieu. Merci de m'avoir accordé votre confiance durant toutes ses années.

Quand je pense au chemin parcouru depuis mon arrivée au laboratoire, j'ai presque du mal à y croire pour votre soutien et votre encouragement.

Le Doctorat d'Université est un apprentissage qui ne peut pas être enrichissant sans analyse, critique et évaluation.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux honorables membres du jury:

Monsieur le Professeur **Yahia CHERRAH**, Directeur de Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse mais aussi et surtout pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Votre soutien, votre aide précieuse et votre extrême gentillesse étaient pour moi un très grand support pour la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Toute ma reconnaissance à Mme **Katim ALAOU**I, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, responsable de l'ERP: Pharmacodynamie, pour la bienveillante attention qu'elle a accordée à ce travail et pour la participation à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

Je remercie profondément Mr le Professeur **Abdelaziz BENJOUAD**, Vice Président de la Recherche et développement de l'Université Internationale de Rabat de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce sujet de Thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très sincère considération.

Je remercie profondément Mr le Professeur **Abdelkhalk OUSSAMA**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Beni-Mellal. Qui me fait l'honneur d'avoir accepté de porter son jugement hautement qualifié sur mon travail. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma plus grande estime d'avoir accepté de siéger parmi le jury.

Ma reconnaissance est adressée également à Mr le Professeur **Abdelali BOULI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Beni-Mellal d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis honoré de sa présence parmi les membres de jury de cette thèse.

Je remercie profondément, le Professeur **Mina AIT ELCADI**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour son extrême gentillesse, son aide et d'avoir accepté de siéger parmi les membres de Jury.

Je remercie vivement mon amie et ma collègue **M^{me} FARIDI Bouchra**, qui par son soutien moral, sa sympathie et sa bonne humeur et son aide précieuse ont rendu ce travail plus facile et agréable.

Et je n'oublierai surtout pas Monsieur **Ahmed LAFROUHI**, que je remercie amplement pour sa constante présence et fournissement des animaux pour l'accomplissement de notre travail.

Je remercie également **Madame Hayat** et **Madame Khadija** pour leurs aides précieuses et pour leurs extrêmes gentillesse.

Je remercie très sincèrement mes collègues de Doctorat : **BOUKHARSA. Y, ELJEMLY. M, LACHGUAR. N, et MARMOUZI. I**, qui ont participé à la réalisation de ce travail, veuillez trouver ici mes vifs remerciements.

Aussi, je ne saurais oublier tous mes collègues de Doctorat ; **DOUKKALI. Z, HOSNI. H, KAMAL. R, KHARBACH. M, SALHI. N, ZAOUI. Y** pour leurs extrêmes gentillesse, veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.

Je ne peux pas vous citer tous, Etudiants - Chercheurs, Collègues et Amis; a toutes et à tous, du fond du cœur, Merci.

En fin, pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, veuillez trouver l'expression de mes sentiments et de ma reconnaissance.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
LISTE DES PUBLICATIONS	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES PHOTOS	17
<i>Introduction Générale</i>	18

PREMIÈRE PARTIE **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Plantes Aromatiques et Médicinales

I. Histoire des plantes aromatiques et médicinales	24
II. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc	25
III. Composition chimique des plantes	26
III.1. Huiles essentielles	26
III.2. Composés organiques non volatils	28
IV. Famille des lamiacées	31
IV.1. Genre Melissa	32
IV.2. Genre Mentha	35

Étude toxicologique

I. Toxicité aiguë (administration unique)	38
I.1. La dose létale 50 : DL ₅₀	38
I.2. Méthode d'étude de la toxicité aiguë selon la ligne directive Européenne de l'OCDE code 423	39
II. Toxicité chronique (administration réitérée)	43
II.1. Observations	44
II.2. Examen Hématologique	44
II.3. Examen Biochimique	45
II.4. Examen anatomo-pathologique	45

Généralités sur les activités pharmacologiques réalisées in vivo

I. Données générales sur le comportement et les psychotropes	47
I.1. Comportement	47
I.2. Psychotropes artificielles	47
I.3. Psychotropes naturels	48
I.4. Modèles comportementaux	49

II. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires	51
II.1. Inflammation	51
1.1. Causes de l'inflammation	52
1.2. Inflammation aigue	53
1.3. Inflammation chronique	56
1.4. Cellules et médiateurs de l'inflammation	56
II.2. Anti-inflammatoires	58
2.1. Anti-inflammatoires conventionnels	58
2.2. Anti-inflammatoires traditionnels	60
II.3. Méthodes de réalisation des tests anti-inflammatoires	61
III. Généralités sur la douleur et les antalgiques	62
III.1. Définition de la douleur	62
1.1. Types de douleur	62
1.2. Physiologie de la douleur	63
III.2. Antalgiques	66
2.1. Analgésiques morphiniques	66
2.2. Analgésiques non morphiniques	67
III.3. Antalgiques traditionnels	67
III.4. Méthodes de réalisation des tests antalgiques	68

Généralités sur les Activités biologiques étudiées in vitro

I. Stress oxydatif et les antioxydants	69
I.1. Stress oxydatif	69
I.2. Antioxydants	69
I.3. Antioxydants naturels	70
I.4. Evaluation de la capacité antioxydante par les tests in Vitro	71
II. Généralités sur les bactéries et les antibiotiques	72
II.1. Définition des bactéries	72
II.2. Culture des bactéries	72
II.3. Antibiotiques	73
II.4. Antibiotiques traditionnels	74
II.5. Description des bactéries étudiées	75

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Extraction et Criblage phytochimique

I. Matériel végétal	79
II. Préparation des extraits	79
II.1. Préparation de l'extrait aqueux	80
II.2. Extraction des huiles essentielles	80
II.3. Détermination du rendement	81
III. Criblage phytochimique des extraits aqueux	81
IV. Dosage phytochimique des extraits	83
V. Analyse des huiles essentielles	85

Étude toxicologique

I. Étude de la toxicité aiguë des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* _____ 87

II. Étude de la toxicité chronique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* _____ 89

*Activités in Vivo des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia**

I. Activité psychotrope _____ 93

I.1. Test de la traction _____ 93

I.2. Test de la cheminée _____ 94

I.3. Test de la planche à trous _____ 94

I.4. Test Rota-Rod _____ 95

II. Activité Anti-inflammatoire _____ 97

II.1. Appareils _____ 98

II.2. Test de l'activité anti-inflammatoire _____ 99

2.1. Induction de l'œdème par la carragénine _____ 99

2.2. Induction de l'œdème par traumatisme _____ 100

III. Activité analgésique _____ 102

III.1. Test de Koster _____ 102

III.2. Test de Tail-Flick _____ 103

*Activités in Vitro des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia**

I. Evaluation du pouvoir antioxydant _____ 106

I.1. Test au DPPH _____ 106

I.2. Test de la réduction du fer « FRAP » _____ 106

I.3. Test de la capacité antioxydante en équivalent Trolox ou «ABTS» _____ 107

II. Evaluation de l'activité antibactérienne _____ 108

II.1. Souches bactériennes _____ 108

II.2. Préparation de prècultures _____ 108

II.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) _____ 108

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Extraction et criblage phytochimique

I. Rendement d'extraction _____ 112

II. Criblage phytochimique des extraits aqueux _____ 112

III. Dosage phytochimique des extraits _____ 114

IV. Analyse des huiles essentielles _____ 116

Étude Toxicologique

I. Toxicité aiguë de <i>Melissa officinalis</i> et <i>Mentha rotundifolia</i>	122
II. Toxicité chronique	123
II.1. Toxicité chronique de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>	123
II.2. Toxicité chronique de l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>	129
<i>Activités in Vivo des extraits aqueux et des huiles essentielles de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i></i>	
I. Activité psychotrope	136
I.1. Test de la traction	136
I.2. Test de la cheminée	136
I.3. Test de la planche à trous	136
I.4. Test Rota-Rod	136
II. Activité anti-inflammatoire	140
II.1. Œdème à la carragénine	140
II.2. Œdème par traumatisme expérimental	143
III. Activité analgésique	147
III.1. Test de Koster	147
III.2. Test de Tail-Flick	149
<i>Activités in Vitro des extraits aqueux et des huiles essentielles de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i></i>	
I. Activité antioxydante	152
I.1. Piégeage du radical libre DPPH	152
I.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP	154
I.3. Pouvoir antioxydant par ABTS	155
II. Activité antimicrobienne	156
<i>Discussion et Conclusion Générale</i>	160
<i>Conclusion et perspectives</i>	171
<i>Références Bibliographiques</i>	173
<i>Résumé</i>	197
<i>Abstract</i>	198
<i>ملخص</i>	199

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail a donné lieu aux résultats suivants :

I. Publications Internationales:

1. **Amina BOUNIHI**, Racha ALNAMER, Ghizlane HAJJAJ, Yahia CHERRAH, AND Amina ZELLOU. Investigation of Essential Oil of *Melissa officinalis* for Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity. International Journal of Pharmacy, 2014; 4 (3): 40-46.
2. **Amina BOUNIHI**, Ghizlane HAJJAJ, Racha ALNAMER, Yahia CHERRAH, AND Amina ZELLOU. In vivo Potential Anti-inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil. Advances in Pharmacological Sciences, 2013.
3. **Amina BOUNIHI**, Ghizlane HAJJAJ, Yahia CHERRAH, AND Amina ZELLOU. Chemical components and neurobehavioral effects of essential oil of *Melissa officinalis* L. from Morocco. World Journal of Pharmaceutical research, 2013; 2 (5): 1206-17.
4. Ghizlane Hajjaj, **Amina Bounihi**, Mouna Tajani, Layachi Chebraoui, Mounia Bouabdellah, Nadia Cherradi, Rouas Lamiaa, Yahia Cherrah, and Amina Zellou. Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity Of Standardized Water Extract Of *Matricaria chamomilla* L. In Morocco. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, 4(1): January-February 2015.
5. M Boudkhili, H Grech, M Aitcadi, B Meddah, A. Zellou, **A Bounihi**, and L Arab. Acute and subchronic toxicity study of *Coriaria myrtifolia* leaves extract in rodent. World Journal of Pharmaceutical research, 2014; 3 (9): 07-15.
6. Ghizlan Hajjaj, **Amina Bounihi**, Mouna Tajani, Yahia Cherrah, and Amina Zellou. In vivo analgesic activity of essential oil and aqueous extract of *Matricaria chamomilla* L. (ASTERACEAE). World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014; 3(5): 01-13.
7. Ghizlane Hajjaj, **Amina Bounihi**, Mouna Tajani, Yahia Cherrah, and Amina Zellou. Anti-Inflammatory evaluation of aqueous extract of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) in experimental animal models from Morocco. World Journal of Pharmaceutical research, 2013; 2 (5): 1218-28.
8. Ghizlane Hajjaj, **Amina Bounihi**, Mouna Tajani, Yahia Cherrah, and Amina Zellou. Evaluation of CNS activities of *Matricaria chamomilla* L. essential oil in experimental animals from Morocco. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2013; 5 (2): 530-534.

II. Communications Nationales et Internationales :

Communications Orales :

1. Sedative and Anti-Inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. 'La Rencontre Internationale des Jeunes Chercheurs sur les Plantes Aromatiques et Médicinales' les 30 et 31 Octobre 2014 à la Faculté des Sciences de Meknès.
2. Chemical components, neurobehavioral effects and potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. 1^{ère} Edition des Journées Doctorales les 10 et 11 juin 2014 à la Faculté des Sciences et Technique de Béni-Mellal.
3. Chemical components and neurobehavioral effects of essential oil of *Melissa officinalis* L. 2^{ème} Journées Internationales Jeunes Chercheurs, les 20 et 21 Décembre 2013, Faculté des Sciences Kénitra.
4. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* présentée au cours de la 4^{ème} journée scientifique de CEDoc-SVS les 15 et 16 février 2013 à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

Communications Affichées :

- * Anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* essential oil. 6^{ème} Journée Scientifique du CEDoc SVS et 3^{ème} Journée Scientifique d'AMADOC, de 04 au 07 Mars 2015, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.
- * Investigation of essential oil of *Melissa officinalis* for acute and sub-chronic oral toxicity. 3^{ème} Edition des Journées Jeunes Chercheurs, Les 20, 21 et 22 Novembre 2014 à l'Institut Scientifique de Rabat.
- * Chemical components and Neurobehavioral effects of essential oil of *Melissa officinalis* L. 9^{ème} Journée de la Recherche et 5^{ème} Journée Scientifique du CEDoc SVS, les 21 et 22 Mars 2014. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.
- * In vivo potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. 2^{ème} Journées Internationales Jeunes Chercheurs, les 20 et 21 Décembre 2013, Faculté des Sciences Kénitra.
- * Composition chimique et toxicité aigue de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* présentée au cours de Premier Congrès de Pharmacologie qui a lieu les 3 et 4 mai 2012 à Rabat.
- * Contribution à l'étude phytochimique et toxicité aigue de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* présentée au cours de la 3^{ème} journée scientifique du CEDoc-SVS, les 27 et 28 janvier 2012. A la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

- * Toxicité aigue de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* présentée au cours de la Journée Scientifique de Toxicologie, organisée par le Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM), à Rabat le 1^{er} Décembre 2011.
- * Contribution à l'étude chimique et toxicité aigue de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* au cours de la Journée d'Actualité Pharmacologique, organisée par le Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc avec le soutien d'European Community-Funded Monitoring Medicines Project à Rabat le 28 juin 2011.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide Acétique
AAS	Acide AcétylSalicylique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AINS	Anti-Inflamatoire Non Stéroïdiens
AIS	Anti-Inflamatoire Stéroïdiens
ALAT	Alanine AminoTransférase
ASAT	Aspartate AminoTransférase
BHA	HydroxyAnisolButyle
BHT	ButylHydroxyToluène
BZD	Benzodiazépine
C3	Complément 3
CAPM	Centre AntiPoison du Maroc
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CONV	Composés Organiques Non volatils
COV	Composés Organiques volatils
CPG-SM	Chromatographie Gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse
CRP	Protéine C Réactive
DL50	Dose Létale 50
DME	Dose Maximal sans Effet toxique
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DPPH	DiPhenylPicrylHydrazyl
DZI	Diamètre de Zone d'Inhibition
EAG	Équivalent d'Acide Ascorbique
EAMO	Extrait Aqueux de <i>Melissa officinalis</i>
EAMR	Extrait Aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ER	Équivalent de Rutine
FRAP	Pouvoir Antioxydant de la Réduction du Fer
FSRT	Faisceau Spino-Réticulo-Thalamique
FST	Faisceau Spino-Thalamique
GABA	Acide Gamma AminoButyrique
HE	Huile Essentielle
HEMO	Huile Essentielle de <i>Melissa officinalis</i>

HEMR	Huile Essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>
IASP	International Association for the Study of Pain
IC50	Concentration Inhibitrice médiane
IFN	Interféron
IL	InterLeukine
IPP	IsoPenténylPyrophosphate
LPS	LipoPolySacharides
MH	Muller Hinton
MO	<i>Melissa officinalis</i>
MR	<i>Mentha rotundifolia</i>
nAChR	Récepteurs nicotiques d'AcétylCholine
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAF	Facteur d'Activation Plaquettaire
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
PPD	Poids Patte Droite
PPG	Poids Patte Gauche
SCGH	Système de Classification Globalement Harmonisé
SNC	Système Nerveux Central
TBHQ	Tert-ButylHydroQuinone
TEAC	Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox
TNF	Tumor Necrosis Factor
VO	Voie Orale

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire.....	51
Figure 2 : Les phases de l'inflammation	55
Figure 3 : Cascade arachidonique et site d'action des anti-inflammatoires.....	59
Figure 4 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif	66
Figure 5 : Comparaison de la teneur en polyphénols entre les deux espèces.	115
Figure 6 : Comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les deux espèces.	116
Figure 7 : Analyse CPG/SM de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>	117
Figure 8 : Analyse CPG/SM de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	119
Figure 9 : Microphotographie de cœur (A), foie (B), rate (C), poumons (D), reins (E) des rats traités par l'HEMO aux doses 100 et 200 mg/kg (MO1 et MO2) et des rats témoins (T).....	129
Figure 10: Microphotographie de cœur (A), foie (B), rate (C), poumons (D), reins (E) des rats traités par l'EAMR aux doses 300 et 600 mg/kg (MR1 et MR2) et des rats témoins (T).....	134
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de <i>Melissa officinalis</i>	142
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>	142
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de <i>Melissa officinalis</i>	145
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>	146
Figure 15 : Effet des extraits de <i>M. officinalis</i> et de <i>M. rotundifolia</i> sur le nombre de crampes effectuées par la souris après injection de l'acide acétique au test de Koster.	148
Figure 16 : Activité antiradicalaire du DPPH : pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	152
Figure 17 : Activité antiradicalaire du DPPH : pourcentage de l'inhibition de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>	153
Figure 18 : Pouvoir réducteur du fer des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i>	154
Figure 19 : Capacité antioxydante en équivalence de Trolox par l'ABTS des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i>	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rendement des extraits aqueux et des huiles essentielles de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i>	112
Tableau 2 : Criblage phytochimique des différentes familles chimiques contenues dans l'extrait aqueux.....	113
Tableau 3 : Quantité des polyphénols dans les extraits	114
Tableau 4 : Quantité des flavonoïdes dans les extraits	115
Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i>	118
Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	120
Tableau 7 : Les résultats des essais de la toxicité aigüe des extraits de <i>M. officinalis</i> et <i>M. rotundifolia</i>	122
Tableau 8 : Poids corporel des rats traités par l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L...	124
Tableau 9: Effet de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L. par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres hématologiques chez les rats Wistar.....	125
Tableau 10 : Effet de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar.....	126
Tableau 11 : Effet de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> sur le poids des organes prélevés chez les rats après 90 jours de traitement par voie orale.....	128
Tableau 12 : Poids corporel des rats traités par l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	130
Tableau 13 : Effet de l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i> L. par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres hématologiques chez les rats Wistar.....	131
Tableau 14 : Effet de l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i> L. par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar.....	132
Tableau 15 : Effet de l'extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i> sur le poids des organes prélevés chez les rats après 90 jours de traitement par voie orale.....	133
Tableau 16 : Action sédative de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L.	137
Tableau 17 : Action sédative de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	138
Tableau 18 : Comportement des souris sur la tige tournante après administration orale de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> et Bromozépam (20 mg/kg).	138
Tableau 19 : Comportement des souris sur la tige tournante après administration orale de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> et Bromozépam (20 mg/kg).	139

Tableau 20 : Effet anti inflammatoire de <i>Melissa officinalis L.</i> sur l'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte arrière chez le rat.....	140
Tableau 21 : Effet anti inflammatoire de <i>Mentha rotundifolia L.</i> sur l'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte arrière chez le rat.....	141
Tableau 22 : Effet anti inflammatoire de <i>Melissa officinalis L.</i> sur l'œdème induit par traumatisme au niveau la patte arrière chez le rat.	143
Tableau 23 : Effet anti inflammatoire de <i>Mentha rotundifolia L.</i> sur l'œdème induit par traumatisme au niveau la patte arrière chez le rat.	144
Tableau 24 : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits de <i>Melissa officinalis</i> au test de Koster	147
Tableau 25 : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits de <i>Mentha rotundifolia</i> au test de Koster	148
Tableau 26 : Influence des extraits de <i>Melissa officinalis</i> et de la morphine (M), vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur chez le rat (Test de Tail-Flick).	149
Tableau 27 : Influence des extraits de <i>Mentha rotundifolia</i> et de la morphine (M), vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur chez le rat (Test de Tail flick).....	150
Tableau 28 : Activité antiradicalaire du DPPH : IC ₅₀ de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> et de <i>Mentha rotundifolia</i>	154
Tableau 29 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>M. officinalis</i> et de <i>M. rotundifolia</i>	157
Tableau 30 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'antibiotique et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes.	158

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: <i>Melissa officinalis L.</i>	33
Photo 2: <i>Mentha rotundifolia L.</i> (Merssita, Menthe à feuilles rondes)	36
Photo 3 : Montage d'Hydrodistillation de la plante (Clevenger)	80
Photo 4 : Dispositif de la traction	94
Photo 5 : Dispositif de la cheminée	94
Photo 6 : Dispositif de la planche à trous	95
Photo 7 : Dispositif de la tige tournante	96
Photo 8 : Digital Pléthysmomètre LE 7500.....	98
Photo 9 : Montage de traumatisme.....	99
Photo 10 : Réaction typique de crampes	103
Photo 11 : Dispositif d'Analgesy-Meter LE 7106.....	104

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Introduction Générale

Depuis les années 80, les plantes médicinales ont fait un retour en force, s'appuyant sur des valeurs sûres testées depuis de longues années par nos ancêtres. Plusieurs facteurs sont derrière ce regain d'intérêts tels que, le coût moins élevé que les médicaments conventionnels, la relative disponibilité surtout dans les régions éloignées, la méfiance vis-à-vis des produits de synthèse ou tout simplement l'envie de consommer " Bio". Aujourd'hui, bien que nous ayons vu le développement spectaculaire des médicaments synthétiques, nombreux pays même développés continuent à compter sur les remèdes traditionnels. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de 80 % d'habitants qui peuplent la planète a essentiellement recours aux médecines traditionnelles (**WHO, 2004**).

Durant ces deux dernières décennies, la recherche en phytothérapie devient une des plus grandes préoccupations scientifiques (**Niyah Njike et al, 2005**). De ce fait, l'OMS a mis une stratégie pour la médecine traditionnelle dont le but est de maximiser les possibilités de cette forme de médecine en tant qu'une source de soins de santé, et de protéger la matière première surtout dans le cas des plantes (**OMS, 2002**). Aussi, elle recommande aux pays en voie de développement d'une part d'initier des programmes concernant l'identification, la préparation, la culture et la conservation des plantes médicinales et d'autre part, d'évaluer la qualité et l'efficacité de ces remèdes à l'aide des techniques modernes.

Le Maroc a une longue histoire de médecine traditionnelle. C'est un pays à la géographie très variée, possède une flore très diversifiée (environ 4200 plantes) dont 800 sont connues en médecine traditionnelle (**Hmamouchi, 2005**). La médecine populaire continue à jouer un rôle important dans le traitement de la plupart des maladies, particulièrement dans les zones rurales (55 % de la population entière) où les gens ont un accès limité aux soins médicaux modernes contrairement aux préparations utilisées dans les remèdes traditionnels qui sont relativement en bon marché et facilement accessibles puisqu'elles peuvent être préparées à partir de plantes localement récoltées (**Aqil and Owais, 2006**). Dans ce contexte socio-économique, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix, joignant l'efficacité scientifique prouvée et l'acceptabilité culturelle (**Diallo, 2005**). La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : sécurité, efficacité et qualité.

Au Maroc, malgré l'importance du secteur des plantes aromatiques et médicinales pour l'économie nationale et régionale, leur exploitation est effectuée dans des conditions souvent artisanales et ignorant les modalités modernes de production, de commercialisation et de valorisation (**Bellakhdar, 1984**). Il existe une automédication familiale, basée sur les connaissances ancestrales et le savoir des tradipraticiens et herboristes dans la matière des plantes médicinales. Les recettes prescrites par les herboristes et les tradipraticiens n'obéissent à aucune norme de qualité, puisqu'il n'existe aucune formulation pour ces recettes traditionnelles marocaines. La plupart des herboristes n'indiquent pas les précautions pour leur utilisation; ils ne connaissent pas non plus les effets secondaires et la toxicité des plantes utilisées. Donc, une étude scientifique plus approfondie sur les avantages et les risques de ces plantes permet une meilleure utilisation en évitant de produire des effets négatifs sur la santé de la population.

En outre, les risques de toxicité dus à la méconnaissance des plantes et à l'absence d'une maîtrise d'une posologie définie et d'un mode d'emploi approprié, incitent à prendre conscience des dangers encourus lors de la médication par les plantes. Durant l'année 2004, l'unité d'information toxicologique du Centre Anti-Poison du Maroc (CAPM) a déclaré une centaine de cas d'effets indésirables aux plantes. Vingt quatre plantes ont été listées dont *Cannabis sativa*, *Myrestica fragrans* et *Peganum harmala*. L'effet indésirable engendre un certain nombre de signes cliniques en particulier neurologiques, digestifs et cardiovasculaires.

Dans d'autres cas, il pourrait y avoir des interactions avec les médicaments de prescription. C'est le cas par exemple de *Ferula communis*, plante dotée de propriétés anticoagulantes dont l'ingestion à des fins alimentaires ou médicinales au même moment que les médicaments anticoagulants, peut entraîner un allongement inattendu du temps de coagulation et par conséquent le risque d'hémorragies (**Lamnaouer, 2005**).

En conclusion, une analyse de l'état actuel du marché des plantes médicinales au Maroc permettra de constater l'existence d'une anarchie qui y règne encore et entrave son intégration dans le secteur socio-économique ; la surexploitation de certaines espèces qui provoque leur disparition dans certaines régions et le risque de toxicité dû aux dangers encourus lors de la médication par certaines plantes.

Il s'avère donc impératif de mettre au point un programme de valorisation de la pharmacopée traditionnelle au sein de la société marocaine. Il faudrait donner une vision scientifique à cet usage traditionnel, de telle sorte à réintroduire la phytothérapie dans un cadre d'analyse physiologique et pharmacologique complet et rigoureux. Un tel projet ne serait réalisable que

par la synergie des études multidisciplinaires portant sur la botanique, la chimie, la toxicologie et la pharmacologie des plantes.

L'objectif de notre thèse vise la valorisation de la famille des lamiacées comme source de molécules renouvelables utilisables dans le domaine pharmaceutique, phytosanitaire et dans le domaine des arômes et parfums.

Melissa officinalis et *Mentha rotundifolia* appartiennent à la famille des lamiacées, ce sont deux plantes aromatiques et médicinales marocaines. Malgré leurs réputations médicinales, peu d'études scientifiques ont été menées sur ces deux plantes aussi bien pour vérifier son efficacité que son innocuité pour les gens qui l'utilisent. Dans ce cadre, nous avons donc choisi de mener une étude scientifique sur ces deux plantes (*Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*) afin de contribuer à sa valorisation par :

- La vérification de son innocuité,
- La confirmation ou infirmation de ses indications thérapeutiques,
- La recherche de nouvelles activités biologiques intéressantes dans différents domaines.

Notre travail est subdivisé en trois parties. Il commence par une synthèse des connaissances bibliographiques, nous nous sommes intéressés à donner un aperçu systématique, relater les différentes utilisations et les propriétés pharmacologiques du *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*. Cet ensemble d'informations va nous servir de base pour nous guider dans le choix du profil pharmacologique que nous allons étudier.

La deuxième et la troisième partie est consacrée à l'analyse phytochimique qui permet d'avoir une idée générale sur la nature des différents constituants chimiques susceptibles d'être responsables des activités pharmacologiques testées.

L'évaluation d'une plante médicinale dans un modèle pharmacologique doit être précédée par l'étude de ses potentialités toxicologiques car une plante ou un extrait peuvent être trop toxique pour être considérés utiles. Nous avons étudié le profil toxicologique de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* à fin de cerner les risques encourus à la suite de son ingestion. Cette étude est focalisée sur la toxicité à court terme (toxicité aiguë) et à long terme (toxicité chronique) de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*. Ces épreuves ont pour objectif de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologiques consécutives aux administrations répétées des extraits.

Enfin, il nous a paru intéressant d'étudier les activités pharmacologiques des deux plantes in *Vivo* (l'activité psychotrope, anti-inflammatoire et analgésique) et in *Vitro* (l'activité antioxydante et antibactérienne).

PREMIÈRE PARTIE
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



Plantes Aromatiques et Médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris ,2006**). Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire.

I. Histoire des plantes aromatiques et médicinales

L'histoire des plantes aromatiques et 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.

Les égyptiens ont constitué la première législation des plantes médicinales en "Pharmacopée" dont le nom dérive du mot égyptien " Farmake" (qui guérit). La recette de l'extrait sur fin du burjoin (*Styrax tonkinensis Caraib*) gravée sur les parois du temple d'Edfou témoigne l'utilisation des plantes aromatiques (**Lapraz., 1979**).

En Asie, et plus particulièrement en chine, l'empereur « Chen-Nong», fut le premier à étudier la phytothérapie et à dégager de l'expérimentation certains effets thérapeutiques ou, au contraire nocifs des plantes. Les plantes aromatiques comme la cannelle (*cinnamomun zeylanicum nees*), le poivre noir (*piper nigrum*) et le gingembre (*zingiber officinale rose*) avaient leur place dans la médecine chinoise vieille de 3000 ans (**Valnet et al., 1978**).

En inde, les drogues végétales entraient dans la composition de formules magiques, moins destinées directement à soigner qu'à soumettre les forces occultes de la nature.

A l'époque Romaine, du moins dans les premiers siècles, les experts en matière de botanique étaient toujours des Grecs, et ce n'est que plus tard que les Romains s'attachèrent à l'étude de la flore et à l'élaboration des médicaments qu'ils en pouvaient obtenir.

Les Arabes furent, eux aussi de grands connaisseurs de plantes, ils avaient hérité, de la grande culture des perses, de solides préceptes médicaux, tout en se référant à Galien pour l'essentiel de sa doctrine.

Discoride (77 après JC) inventorie plus de 600 plantes d'origine végétale (**Dioscoride., 1959**), comprenant une centaine de plantes aromatiques. Les auteurs arabo persans comme Ibn al Baytâr (1877-1883) ont ajouté de nombreuses espèces nouvelles à cet arsenal thérapeutique.

Depuis cette époque jusqu'à nos jours, les herbes, les baies, les racines n'ont pas cessé d'être l'objet d'étude approfondie, si bien que chaque jour leurs vertus soient mieux reconnues et plus utilement appliquées. Aujourd'hui, malgré la profusion des médicaments purement chimique, les plantes remportent toujours de nouvelles victoires (**Encyclopedie, 1970**).

II. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Le Maroc est parmi les cinq premiers pays floristiquement les plus riches à l'échelle du bassin méditerranéen (**Quezel and Medail., 1994**). Le climat varié et les conditions écologiques hétérogènes ont favorisé la prolifération de plus de 4200 espèces et sous espèces (**Ibn Tattou., 1989**). Les familles les plus importantes, comptant plus de 100 espèces chacune, sont au nombre de neuf seulement et regroupent plus de la moitié de la richesse spécifique totale du pays.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle au Maroc sont estimées aux près de 800 espèces spontanées, cultivées ou importées, réparties dans 107 familles et 352 genres (**Hmamouchi, 2001**). Ces espèces sont impliquées dans plus de 600 recettes et utilisées pour traiter 27 maladies dont les plus importantes sont les affections concernant le système digestif, le système respiratoire, le système cardiovasculaire et les affections dermatologiques.

Selon les résultats d'une enquête socio-économique réalisée sur la médecine traditionnelle au Maroc, 71 % des personnes interrogées utilisent les plantes médicinales et aromatiques pour se soigner (**Hamamouchi., 1999**). Cependant, plusieurs problèmes en relation avec l'utilisation des plantes médicinales d'une façon traditionnelle risquent d'exposer la santé à des maladies et à des accidents graves. Parmi ces problèmes, la diversité et la complexité des noms vernaculaires qui rend difficile l'identification des plantes à utiliser, les posologies et la durée d'utilisation ne sont pas précises et varient d'un herboriste à l'autre, l'utilisation de la même plante pour plusieurs affections désignées comme une seule maladie, les produits utilisés sont généralement mal conservés et de mauvaise qualité ce qui risque de les rendre toxiques. Pour cela, une étude scientifique de toutes les plantes médicinales et une réglementation de leur prescription et leur détention sont impératives pour une utilisation sans danger.

III. Composition chimique des plantes

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe. La plupart des scientifiques définissent les substances naturelles comme des composés chimiques qui se trouvent dans de nombreuses familles et espèces végétales (**Firn, 2004**).

Le développement des diverses techniques d'extractions, d'isolement et d'indentification a permis l'utilisation de ces composés dans diverses industries (pharmaceutiques, agro alimentaires, cosmétiques et parfumeries). La liste des plantes entrant précisément dans ce cadre est exhaustive et comme elles sont utilisées sous formes de tisanes, extraits ou préparations complexes, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribuées à des composés tels que les alcaloïdes et ces dérivés, les terpènes et les composés polyphénoliques.

Aujourd'hui il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (**Potterat et Hostettmann, 1995**). Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (**Iserin et al., 2007**). Cette composition est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatil (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (**Cisowski, 1985**), ainsi de phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (**Kubeczka et al., 1982**).

III.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) appelées aussi « essences » sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation (**Iserin et al., 2007**). La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Les HE se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire (**Guy, 1997**). Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire (**Kaloustian et al., 2008**).

Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans une région particulière de la plante telle que les feuilles, écorces ou fruits, et généralement quand elles se produisent dans divers organes de la même plante, elles présentent des compositions chimiques différentes (**Conner D.E., 1993**).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes (**Cowan MM., 1999**). Ce sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent principalement à deux grandes familles de composés chimiques : le groupe des composés terpéniques sont représentés principalement par des monoterpènes: (C 10) cinéol, menthol... qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (**Lamarti et al., 1994**), et quelques sesquiterpènes: (C15) caryophyllène, humulène... (**Loza-Tavera., 1999**) bien que des diterpènes (C20) peuvent aussi être présents (**Dorman and Deans., 2000**). Le groupe des composés aromatiques: des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits) (**Bruneton., 1999**).

Les monoterpènes et leurs dérivés (alcools, esters, acétates, ...) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, Ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante (**Loza-Tavera., 1999, Robinson., 1991**) ou (**Lamarti., 1994**). Leur étude chimique est compliquée, par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir (**Robinson., 1991**). Exemple de quelques monoterpènes: menthol, alpha terpinéol, linalol, lavandulol, géraniol...

Plusieurs facteurs peuvent être responsables du polymorphisme chimique des huiles essentielles. Les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction. Les facteurs génétiques et le cycle végétatif peuvent également influencer sur cette variabilité (**Echeverrigaray et al., 2001 ; Hudaib, 2002**).

Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Amarti, 2009**). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite in vitro ainsi que les activités antispasmodique, diurétique ou expectorante (**Hans, 2007**), antioxydante, anti-inflammatoire et elles présentent également un fort pouvoir antifongique (**Chami et al., 2005 ; Giordani et Kaloustian, 2006; De Billerbeck, 2007 ; Juhas et al., 2009**). L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la levure (**Mann et al., 2000**).

En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Giordani et Kaloustian, 2006**).

Par ailleurs, l'application de ses huiles essentielles présente un grand intérêt dans plusieurs domaines. Ainsi, parmi les essences les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent aux lamiacées : thym, origan, sarriette, lavande, menthe, romarin et sauge.

Les variations de la composition des huiles essentielles provenant d'un même phénotype se développant dans le même environnement sont l'expression de différences génotypiques. Elles peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations.

III.2. Composés organiques non volatils

Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007**).

a. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits et graines) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Crozier et al., 2006**).

Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires. Ce sont surtout des antiseptiques (arbutoside de la busserole), des antalgiques et des anti-inflammatoires (**Garnero, 2000**). On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples à des substances plus complexes. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques.

Les principales classes de composants phénoliques sont: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young., 1999 ; Tapiero et al., 2002**).

✓ Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al., 2006**), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronnes, flavonol jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments, dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet.

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, auronnes, chalcones, anthocyanins (**Effendi et al., 2008**). Ils interviennent probablement pour protéger les plantes des herbivores et contrôler le transports des auxines (**Judd et al., 2002**). Les flavonoïdes hétérosidiques sont hydrosolubles et solubles dans les alcools. Les flavonoïdes lipophiliques des tissus superficiels des feuilles sont solubles dans les solvants polaires et dans les solvants moyennement polaires (comme par exemple le dichlorométhane) (**Bruneton, 1999**). Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, anti-enzymatique et hépatoprotectrice ; ils jouent un rôle important dans le système de défense et antivirales (**Iserin, 2001**).

✓ Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène (**Schauenberg et Paris, 2006**).

Les tanins représentent généralement la principale partie de l'extrait polyphénolique. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (**Khanbabae et Ree., 2001**).

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**). Peu de choses sont connues concernant leur rôle biologique sur la plante mais leur présence confère à cette dernière des propriétés astringente, antiseptique, antioxydante et antidiarrhéique (**Vivas, 2002**).

✓ Les coumarines

Les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Igor, 2002**). Elles sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées.

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau.

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie et dans les produits cosmétiques (**Kansole, 2009**).

b. Les terpènes

La très grande majorité des terpènes sont spécifiques du règne végétal mais on peut les rencontrer chez les animaux. Tous les terpènes et les stéroïdes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) (**Bruneton, 1999**). Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leurs structures, les terpènes sont subdivisés en : monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tetraterpènes et polyterpènes.

c. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (**Guignard, 2000**). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (**Dellile, 2007**). Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (**Judd et al., 2002**). De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, est extraite de la belladone mortellement toxique (*Atropa belladonna*) et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique (**Hans, 2007**). Les alcaloïdes sont utilisées comme anticancéreux, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007**).

d. Les saponines

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau (**Hans, 2007**). Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales ; elles existent sous deux formes : les stéroïdes et les triterpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (oestrogène, cortisone). Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (**Eberhard et al., 2005**). Les saponines possèdent une grande variété d'activités biologiques telles que : antipyrétique, analgique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire et anticoagulante. Ils ont des propriétés tensioactives et biologiques importantes et sont utilisés dans des domaines variés tels que l'industrie, la pharmacie et la cosmétologie (**Lautrette, 2004**).

IV. Famille des lamiacées

La famille des lamiacées (Lamiaceae) ou labiées (Labiatae) est l'une des familles les plus répandues dans le règne végétal avec plus de 7200 espèces réparties en environ 240 genres et 7 sous-familles (**Braüchler et al., 2010**). Les espèces de cette famille se trouvent sous forme de plantes herbacées ou arbustes, très rarement arbres ou lianes avec une tige très souvent quadrangulaire, inflorescence en cymes axillaires, calice souvent bilabié et avec corolle toujours tubuleuse plus ou moins bilabiée (**Chadefaud et Emberger, 1960**). Elles se répartissent sur tout le globe, mais principalement du bassin méditerranéen à l'Asie Centrale.

Les représentants spontanés de cette famille au Maroc sont 207 espèces réparties entre 29 genres dont 45 de ces espèces constituent *Teucrium* qui est classé le premier genre de la famille. Les autres genres importants sont *Mentha*, *Thymus*, *Sideritis*, *Salvia*, *Marrubium* et *Stachys*, avec respectivement 20, 19, 15, 14, 13 et 11 espèces. 9 genres, dont *Melissa*, *Cleonia*, *Hysopus* et *Prasium*, ne sont représentés chacun que par une seule espèce (**Quezel et Santa, 1963 ; Fennane, 1987**). Les Lamiacées possèdent une place économique importante en raison de leurs utilisations médicinales, culinaires et cosmétiques.

Les principaux métabolites secondaires décrits dans cette famille sont les terpènes, les composés phénoliques, les flavonoïdes ou encore les iridoïdes glycosidiques (**Kulišić et al., 2006; Taskova et al., 1997**). En outre, l'accumulation de certains de ces composés peuvent servir comme marqueurs chimiotaxonomiques, c'est le cas par exemple des iridoïdes et de l'acide rosmarinique (**Valant-Vetschera et al., 2003; Zgórka et Głowniak, 2001**).

La famille des lamiacées est bien connue par ces poils glanduleux sécrétant d'huiles essentielles très importantes économiquement (Cantino et Sanders, 1986). Ces huiles essentielles sont généralement obtenues par vapo- ou hydrodistillation à partir des plantes fraîches ou séchées. Toutefois, si cette famille est généralement considérée dans la littérature comme une source de composés aromatiques, il faut noter qu'il existe des genres, dont les membres ne produisent que des traces d'huiles essentielles.

IV.1. Genre *Melissa*

Melissa est un genre de la famille des lamiacées, il comprend une seule espèce *Melissa officinalis* L.

a. Classification botanique

La classification botanique place *Melissa officinalis* dans :

Règne: *Plantae*

Sous-Règne: *Tracheobionta*

Division : *Spermatophyta*

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones vraies

Sous-Classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Melissa*

Espèce : *Melissa officinalis* (Dupont et Guignard, 2007)

L'espèce *Melissa officinalis* L. connu sous le nom vernaculaire français 'Mélisse, Citronnelle', arabe 'Tariane' et Marocain 'hbak tranj' حبق الطرنج.



Photo 1: *Melissa officinalis L.*

b. Description botanique

La mélisse (Photo 1) est une plante vivace herbacée, à tige quadrangulaire rameuse, haute de 30 à 80 cm, feuilles opposées, pétiolées, ovales, crénelées, gaufrées, sont luisantes, d'un beau vert foncé sur le dessus, plus pâles en dessous. Fleurs de coloration blanche ou rose, apparaissent de juin à septembre, sont bilabiées avec une lèvre inférieure à 3 lobes inégaux. Le fruit entouré par un calice persistant, contient des graines luisantes brun foncé.

c. Répartition géographique et habitat

La mélisse est répandue dans la flore naturelle de la région Méditerranéenne, dans l'Europe du Sud, l'Afrique de Nord et à l'Est jusqu'au Caucase et l'Iran de Nord (**Toth et al., 2003 ; Dastmalchi et al., 2008**). Haies et bois, cultivée dans les jardins en Europe (**Hmamouchi, 1999**).

d. Usage médical traditionnel

La mélisse est connue depuis des siècles en tant que plante médicale. Le philosophe, écrivain et médecin perse Avicenne (980 - 1037) recommandait la mélisse pour renforcer le cœur. L'écrivain anglais John Evelyn (1620 - 1541) a décrit la mélisse comme une plante qui structure le cerveau, renforce la santé mentale et supprime la mélancolie (**Bahtiyarca Bagdat et Cosge, 2006**).

Cette plante est très utile pour le traitement des agitations nerveuses, comme somnifère (**Herodez et al., 2003**). Dans la médecine traditionnelle, la mélisse est utilisée pour soigner : céphalée, nervosité, troubles gastro-intestinaux, bronchite, dépression, hystérie (**Herodez et al., 2003 ; Dastmalchi et al., 2008**), rhumatisme, flatulence, nausée, anémie, vertige, syncope, asthme, aménorrhée, insuffisance cardiaque, troubles de la conduction cardiaque, insomnie, épilepsie, psychose, ulcères, blessures (**Dastmalchi et al., 2008**), troubles de l'abdomen inférieur, migraine, faiblesse nerveuse, mal de dents et hypertension artérielle (**Herodez et al., 2003**).

e. Propriétés Pharmacologiques

Des travaux scientifiques ont été effectués pour confirmer certains usages traditionnels de cette plante comme les propriétés antispasmodique, eupeptiques et cholérétiques.

une étude a mis en évidence l'activité cytotoxique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* (**De Sousa et al., 2004**). Actuellement, la mélisse est utilisée dans le traitement des troubles nerveux, de l'irritabilité et des troubles du sommeil. Elle est souvent associée au houblon (*Humulus lupulus*), à la passiflore (*Passiflora incarnata*), ou à la valériane (*Valeriana officinalis*) (**Babulka, 2005; W.H.O., 2004; Wynn and Fougère, 2007**). Même si aucune étude n'a été conduite chez le cheval, la mélisse est utilisée pour ses propriétés anxiolytiques et calmantes. Elle est prescrite chez les chevaux présentant des troubles organiques liés au stress, comme des ulcères gastriques (**Thiébaud, 2010**). Un produit phytothérapeutique vétérinaire contenant des extraits de mélisse, destiné au traitement et à la prévention des états anxieux des chevaux, est disponible en France.

f. Caractéristiques chimiques

La quantité de l'huile essentielle présente dans la mélisse n'est pas très importante (0,02–0,32% du poids sec de la mélisse) (Ribeiro et al., 2001 ; Toth et al., 2003 ; Carnat et al., 1998), mais son prix est élevé (Ribeiro et al., 2001). L'huile essentielle de mélisse présente des activités antibactériennes, anti-parasitiques, antihistaminiques et antifongiques (Sadraei et al., 2003). Les principaux composés de l'huile essentielle sont le citral (représenté par les deux stéréo-isomères néral et geranial), le caryophyllène et le citronellal (Toth et al., 2003 ; Carnat et al., 1998 ; Fialová et al., 2008 ; Rozzi et al., 2002). D'autres composés y sont présents en petites quantités tels que germacène D, ocimène, citronellol (Carnat et al., 1998), oxyde de caryophyllène, néral acétate (Rozzi et al., 2002), linalol, geraniol (Ribeiro et al., 2001).

La mélisse est composée de flavonoïdes, lutéoline, quercétol, acides phénols, caféine, chlorogénique, labiatique, mucilage, dérivés terpéniques (Hmamouchi, 1999).

IV.2. Genre *Mentha*

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous Classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Mentha*

Espèce: *Mentha rotundifolia* (Iserin et al., 1997)

Mentha est un genre de la famille des lamiacées. Il comprend 20 espèces répandues dans le monde (Chalchat et al., 2000). L'huile essentielle de la menthe est produite en grande échelle partout dans le monde. Elle peut contenir jusqu'à 200 composants. Le menthol et la menthone sont les constituants majeurs (70%) des huiles essentielles de la majorité des menthes (Lawrence et al., 1972). Ces composés sont exploités comme matière première dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (Encyclopaedia Britannica, 1965).

Dans notre étude nous nous intéressons à l'espèce *Mentha rotundifolia* L. connu sous le nom vernaculaire français 'Menthe a feuilles rondes', arabe 'Merssita' مرسيطة et tamazight 'Timijja, Timersad' (Photo 2).



Photo 2: *Mentha rotundifolia* L. (Merssita, Menthe à feuilles rondes)

a. Description botanique

Herbe a souche traçante, émettant de nombreuses tiges annuelles très odorantes, feuilles opposées-décussées, atténuées en pétiole, inflorescences en faux verticilles denses feuilles, distants, calice presque bilabiés, a 5 dents aigues, corolle blanche rosée ou violet pale, a 4 lobes égaux. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher ; comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme. Les petites fleurs sont rassemblées en épis terminant les rameaux ; elles s'épanouissent de juillet à septembre. La hauteur de la plante est de 25 à 80 cm, la fleur et de 5 mm de long.

b. Répartition géographique et Habitat

La menthe à feuille ronde peuple les lieux humides et inondés. Elle pousse sous les bioclimats semi-arides, humides a variantes chaudes, tempérées et dans des étages de végétations de l'infra-méditerranéen et méso-méditerranéen (**El Rhaffari, 2008**).

Au Maroc : Littoral (bani Snassen), Secteur oranais Montagnard de Deddou a ghar Rouban, Rif oriental et occidental, de la Moulouya a Oued Laou, y compris l'Atlas rifain. Maroc central (partie septentrionale) et Maroc central (partie méridionale) (**Hmamouchi, 1999**).

c. Usage médical traditionnel

À la région de Zaër, la décoction des feuilles est très appréciée dans le traitement des douleurs gastriques, des diarrhées, des refroidissements et des affections respiratoires. En cataplasme ou en inhalation, les feuilles sont recommandées en cas de fièvre (**Lahsissene et al., 2009**). Les abcès et les furoncles sont traités par les feuilles écrasées, ou bien par la décoction des feuilles. Cette dernière préparation, en bain de bouche, supprimerait les douleurs dentaires (**Boukef, 1986**). Aussi, elle est utilisée contre les affections gastriques, Pulmonaires, antispasmodiques, carminatives, insecticides et alimentaires (**Hmamouchi, 1999**).

Cette menthe est très utilisée en infusion contre les palpitations de l'aorte, comme tonifiant. C'est aussi une plante échauffante (**El Rhaffari, 2008**).

d. Propriétés Pharmacologiques

Cette plante est dotée de propriétés anti-inflammatoire, antiseptique et expectorante. La plus part des travaux effectués sur *M rotundifolia L.* visent a déterminer la composition phytochimique est plus spécialement des huiles essentielles de différents zone dans le monde (**Veskutonis, 1996; Daniel et al., 2002; Gulluce et al., 2007; Brada et al., 2006**). On note aussi les travaux faits par (**Benayad, 2008**) sur l'effet insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

e. Caractéristiques chimiques

On peut trouver comme composants principaux : la carvone ou dihydrocarvone (43%), la néoisopulégone (52,3%), pipériténone, oxyde de pipériténone et pipéritone (jusqu'à 88%). (**Bellakhdar et al., 1983 ; Holeman et al., 1988**).

Étude toxicologique

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son éventuelle introduction en thérapeutique. En effet, en plus de l'efficacité, il ne doit pas se produire pour la dose active des effets toxiques et néfastes pour l'organisme. Il faut donc définir le rapport bénéfice risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Ceci ne peut être réalisé que par l'intermédiaire de deux types d'étude, d'une part l'efficacité chez l'animal (pharmacologie expérimentale) et chez l'homme (effets bénéfiques), d'autre part une étude de sécurité chez l'animal (toxicologie) et chez l'homme (effets indésirables) (**Dupont, 1987; Claude, 1985; Antonious et al., 2006; Buenz, 2006**).

La toxicologie doit donc veiller à l'innocuité des plantes médicinales. Mais sa position ne doit pas être seulement négative et réglementaire, bien au contraire elle doit aider aussi à l'innovation, au choix des plantes médicinales à des doses bénéfiques. En définitive, elle doit apporter à la phytothérapie et à la consommation des plantes une certaine garantie et une certaine caution. L'évaluation de la sécurité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance. Cependant, l'étude de la toxicité aiguë reste le jalon indispensable dans toute étude toxicologique.

I. Toxicité aiguë (administration unique)

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose qui tue 50 % des animaux d'expérience (DL_{50}) ainsi que la dose maximale sans effet toxique (DME) c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin (**Traore, 1999**). La toxicité peut être appréciée entre autre par la détermination de la DL_{50} .

I.1. La dose létale 50 : DL_{50}

La dose létale 50 % (DL_{50}) correspond à la dose capable de tuer dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale. Dans un délai généralement court, fixé au minimum à sept jours et au maximum à quatorze jours. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien : mort ou survie des animaux.

L'étude de la toxicité aiguë peut être réalisée selon différentes méthodes ; Méthode de Dragstedt et Lang ; Méthode de Karber et Behrens ; Méthode de Miller et Tainter ; Méthode de Trevan ; Méthode de Litchfield et Wilcoxon ; Méthode selon la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423.

Parmi ces méthodes on définit la méthode de la ligne directrice européenne de l'OCDE code 423

I.2. Méthode d'étude de la toxicité aiguë selon la ligne directrice Européenne de l'OCDE code 423

La méthode par classe de toxicité aiguë décrite dans la Ligne directrice Européenne code 423 est un processus utilisant des animaux d'un seul sexe par étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont nécessaires en moyenne pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette méthode est reproductible, utilise très peu d'animaux comparée aux autres méthodes de toxicité aiguë (Lignes directrices 420 et 425) ; elle permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire. La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances dans le Système de Classification Globalement Harmonisé (SCGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë. Cette méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL50. Comme la mort d'un nombre d'animaux reste le principal effet observé, la méthode permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée létale. Toutes les informations disponibles sur la substance d'essai doivent être rassemblées avant de procéder à l'essai. Ces informations contiendront l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques et les résultats obtenus dans tout autre essai de toxicité *in vitro* et *in vivo* ; elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (des femelles) sont utilisés à chaque étape (**Roll R et al, 1986**). L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire:

- Arrêt de l'essai,
- Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

✓ Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22°C (\pm 3°C). Le taux d'humidité relative devrait être 30 % au moins et ne pas dépasser 70 %. Sauf pendant le nettoyage de la salle, une humidité relative entre 50 et 60 % est idéale. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose.

Toutefois le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

✓ Nombre d'animaux et niveaux des doses

Chaque étape nécessite trois animaux. Pour la dose initiale on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2000 mg/kg.

Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer de la mortalité parmi quelques-uns des animaux traités.

Lorsque des informations disponibles suggèrent une mortalité peu probable au niveau de dose initial le plus élevé (2000 mg/kg de poids corporel), il faut procéder à un essai limite.

En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée pour des raisons liées au bien-être des animaux est de 300 mg/kg.

L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose est dicté par le moment du début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu.

Exceptionnellement, et lorsque cela est justifié pour répondre à une exigence découlant d'un besoin spécial d'une réglementation, on peut prendre en considération d'utiliser une dose prédéterminée maximale supplémentaire de 5000 mg/kg.

L'essai de substances en catégorie 5 du SCGH (2000-5000 mg/kg) doit être découragé pour des raisons de protection des animaux. Un tel essai est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

✓ **Observations**

Des observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité.

Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement.

L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

✓ **Poids corporel**

Le poids individuel de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite une fois par jour. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés.

✓ **Résultats**

1- Tableau des résultats et niveau de dose pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de la mortalité, nature, gravité et durée des effets);

2- Tableau des poids corporels et changements de poids; poids individuels des animaux le jour du traitement, durant les jours d'observation, et au moment de la mort ou du sacrifice;

3- Date et heure de la mort;

4- Pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et le cas échéant leur réversibilité.

✓ Observation des manifestations de la toxicité aiguë

Elle est nécessaire au cours de l'étude de la toxicité aiguë d'une substance, de déterminer la DL50 qui permet de la situer sur l'échelle comparative de toxicité de substances chimiques de HODGE et STERNER (**Claude, 1988**). Dans tous les cas, la détermination de la DL50 se fait pour tout médicament nouveau, elle permet de caractériser le médicament par son degré de toxicité et d'évaluer les précautions à prendre lors de l'utilisation du médicament en thérapeutique. La DL₅₀ permet de classer les différentes molécules chimiques en 5 catégories:

- $DL_{50} \leq 1 \text{ mg/kg}$: sont considérées comme très hautement toxiques ;
- $1 \text{ mg} \leq DL_{50} \leq 50 \text{ mg/ kg}$: hautement toxiques ;
- $50 \text{ mg} \leq DL_{50} \leq 500 \text{ mg}$: moyennement toxiques ;
- $500 \text{ mg} \leq DL_{50} \leq 1000 \text{ mg}$: faiblement toxiques ;
- $1000 \text{ mg} \leq DL_{50} \leq 5000 \text{ mg}$: très faiblement toxiques.

Les troubles de toxicité se manifestent souvent après une longue imprégnation de l'organisme. Des essais de toxicité par administration répétée chez l'animal sont toujours effectués lorsqu'une molécule présente un éventuel intérêt thérapeutique.

II. Toxicité chronique (administration répétée)

Une étude de toxicité chronique a pour objectif de caractériser le profil d'une substance chez une espèce de mammifère, à la suite d'une exposition prolongée et répétée. La durée des études de toxicité chronique concernant des effets autres que le néoplasie, fait toujours l'objet de nombreuses discussions. Dans les conditions du présent essai, les effets tels que la cancérogénèse et ceux qui n'ont pas spécifiquement des effets raccourcissant la vie, qui demandent une longue période de latence ou sont cumulatifs, peuvent ne pas se manifester. En dehors de ces cas, l'application des présentes Lignes directrices fournira des résultats permettant d'identifier la majorité des effets chroniques et d'établir des relations dose-effets. Idéalement, la conception et la conduite de l'étude doivent permettre la détection de la toxicité générale comprenant les effets neurologiques, physiologiques, biochimiques et hématologiques, ainsi que les effets morphologiques (pathologie) liés à l'exposition.

La toxicité résultant de l'administration répétée d'un xénobiotique à un animal de laboratoire est souvent exprimée de façon ambiguë : on parle de toxicité chronique, c'est la toxicité qui se manifeste après un délai relativement long. Ces épreuves ont pour objet d'apprécier la toxicité du médicament et de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et /ou anatomopathologiques provoqués par administration répétée et établir leur apparitions en fonction de la posologie.

Les trois principales voies d'administration sont l'ingestion orale, la pénétration cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des propriétés physiques et chimiques de la substance à tester et il doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas codifiés strictement mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais.

Le choix des doses peut s'appuyer sur des bases solides, issues des études de la toxicité aiguë, et peut espérer choisir trois niveaux de dose provoquant :

- Pour la dose forte des effets toxiques appréciables ;
- Pour la dose intermédiaire des effets toxiques minimales afin d'obtenir si possible une relation dose-effets ;
- Pour la dose faible aucun effet toxique (mais l'effet pharmacodynamique ou thérapeutique souhaité), afin de pouvoir évaluer le niveau de dose sans effets.

II.1. Observations

Un examen clinique soigneux doit être pratiqué au moins une fois par jour. Des observations supplémentaires doivent être faites chaque jour en prenant des mesures appropriées pour réduire la perte d'animaux pour l'étude, par exemple en autopsiant ou en réfrigérant les animaux trouvés morts et en isolant ou en sacrifiant les animaux affaiblis ou moribonds. Il y a lieu de procéder à des observations minutieuses non seulement pour détecter l'apparition et la progression des effets toxiques, mais aussi pour minimiser les pertes dues aux maladies, à l'autolyse ou au cannibalisme.

Les manifestations cliniques, en particulier neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité doivent être relevées pour tous les animaux. La date d'apparition et la progression des signes toxiques, y compris les tumeurs suspectées doivent être enregistrées.

Chaque animal sera pesé au moins une fois par semaine durant la période d'essai. La prise de nourriture sera déterminée hebdomadairement, sauf si l'état de santé ou les variations de poids corporel nécessitent d'autres dispositions.

II.2. Examen Hématologique

Un examen hématologique (c'est-à-dire le taux d'hémoglobine, l'hématocrite, le nombre total de globules rouges, le nombre total de globules blancs, les plaquettes ou d'autres études de coagulation) doit être effectué à chaque mois ainsi qu'au terme de l'étude et ce, sur des échantillons de sang prélevés sur les rats de chaque sexe dans tous les groupes. Ces prélèvements seront faits sur les mêmes rats à chaque moment.

Si les observations cliniques indiquent une détérioration de la santé des animaux au cours de l'étude, il faut établir la formule sanguine des animaux concernés.

La formule sanguine est établie à partir d'échantillons prélevés sur les animaux du groupe correspondant à la dose la plus élevée et les témoins. Si on constate un écart important entre les sujets de ce groupe et les témoins, elle est aussi établie pour le groupe correspondant à la dose directement inférieure. L'examen de ce groupe est aussi pratiqué si les résultats anatomopathologiques l'imposent.

II.3. Examen Biochimique

A l'intervalle de chaque mois et au terme de l'étude, des échantillons de sang sont prélevés en vue de déterminations de chimie clinique sur tous les rats de chaque sexe dans tous les lots. De plus, un échantillon doit être prélevé au début de l'expérimentation. Le plasma est préparé à partir de ces échantillons et les déterminations suivantes sont effectuées :

- teneur totale en protéines ;
- concentration en albumine ;
- examen des fonctions hépatiques (activité de la phosphatase alcaline, activité de la transaminase glutamo-pyruvique et activité de la transaminase glutamo-oxaloacétique), gamma glutamyl transpeptidase, ornithine décarboxylase ;
- métabolisme des hydrates de carbone (glycémie à jeun) ;
- examens des fonctions rénales (azote uréique du sang).

II.4. Examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique, tant macroscopique que microscopique, est souvent la pierre angulaire de l'étude de toxicité subchronique. Il faut donc accorder toute l'attention nécessaire à ces observations qui doivent être décrites et rapportées en détail, y compris le diagnostic.

L'autopsie générale doit être faite sous la direction d'un spécialiste en anatomo-pathologie des animaux de laboratoire. Il y a lieu de faire l'autopsie générale de tous les animaux, y compris ceux qui sont morts durant l'expérimentation ou qui ont été achevés dans un état moribond. Avant le sacrifice de l'ensemble des animaux, des échantillons de sang doivent être prélevés sur tous les animaux en vue de l'établissement des formules sanguines. Toutes les lésions visibles, les tumeurs ou les lésions suspectées d'être des tumeurs, qui sont visibles à l'œil nu, doivent être conservées. On doit s'efforcer d'établir une corrélation entre les observations macroscopiques et les résultats microscopiques.

Tous les organes et tissus de tous les animaux doivent être conservés en vue de l'examen microscopique.

Histopathologie

Toutes les tumeurs et autres lésions visibles à l'œil nu doivent être examinées au microscope.

De surcroît, les procédures suivantes sont recommandées :

(a) Examen microscopique de tous les organes et tissus conservés, avec une description complète de toutes les lésions découvertes.

(b) La connaissance de la fréquence des lésions qui apparaissent habituellement chez les animaux de la souche utilisée (dans les mêmes conditions expérimentales c'est-à-dire « témoin historique») est souhaitable pour évaluer l'importance des changements observés chez les animaux exposés.

Généralités sur les activités pharmacologiques réalisées in vivo

I. Données générales sur le comportement et les psychotropes

I.1. Comportement

Le comportement est défini comme étant l'ensemble des manifestations motrices d'un individu observables à un moment et dans un lieu particulier (**Campan et Scapini, 2002**). Autrement dit, c'est un moyen d'expression et d'action qui permet à un individu de maîtriser les relations avec son environnement.

I.2. Psychotropes artificielles

Les médicaments psychotropes sont des substances qui agissent sélectivement sur certaines fonctions du système nerveux central (SNC) en particulier sur les structures qui régissent la vie psychique (humeur, affectivité, perception, conscience et comportement).

Les psychotropes sont définis comme l'ensemble des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle qui ont un tropisme psychologique, c'est-à-dire qui sont susceptibles de modifier l'activité mentale sans préjuger le type de cette modification.

La classification a été établie par Jean DELAY en 1957, qui les a séparés en 3 groupes, selon si la substance exerçait un effet déprimeur (leptique), activateur (analeptique) ou déviateur (dysleptique). Pour chaque groupe les substances ont des effets sur l'état affectif (sphère thymique, état d'esprit dans lequel se trouve l'individu), sur l'état intellectuel, et / ou la vigilance (sphère noétique, la capacité qu'il a de faire les choses).

Mécanisme d'action des médicaments psychotropes (Landry et al., 2008)

Parmi les médicaments les plus répondeurs de la classe psychotropes les benzodiazépines et les barbituriques sont des molécules anxiolytiques, hypnotiques, myorelaxant et anticonvulsivant utilisées principalement dans la réduction des états anxieux par l'induction de sédation.

Le mode d'action des BZD est la potentialisation de l'effet inhibiteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans le système nerveux central (SNC).

Le GABA est un acide aminé neuromédiateur synthétisé par des neurones du SNC. Il est donc présent dans le cerveau, plus précisément stocké dans les terminaisons présynaptiques et libéré dans les fentes synaptiques des neurones. Il se fixe entre autres sur le récepteur GABA-A (situé du côté postsynaptique) pour déclencher une activité inhibitrice sur les transmissions neuronales par hyperpolarisation cellulaire du neurone post synaptique, (ouverture du canal

chlore permettant la libération des ions chlorures dans la fente synaptique, le neurone post synaptique s'en trouvant alors moins excitable).

C'est le principal neurotransmetteur inhibiteur des fonctions neuronales ; on peut l'identifier à un « anxiolytique endogène ».

L'existence de récepteurs cérébraux spécifiques aux benzodiazépines était démontrée simultanément par une fixation spécifique et de forte affinité des benzodiazépines pour ce récepteur. Il existe une bonne corrélation entre l'affinité des benzodiazépines pour le récepteur et leurs effets pharmacologiques. La répartition des récepteurs dans d'autres tissus est très faible ou inexistante et au niveau du cerveau on observe une distribution particulière de ces récepteurs : ils sont très nombreux dans le cortex cérébral et plus rares dans le système limbique.

Sur le plan moléculaire, le récepteur des benzodiazépines est associé à sous unité alpha du complexe formé par le récepteur GABA-A /canal chlore.

La liaison des BZD sur leur site déclenchent une modification allostérique de la structure du récepteur et potentialisent alors l'effet inhibiteur du GABA en facilitant l'ouverture du canal chlore : ce sont des modulateurs du récepteur GABA-A.

Les BZD ne sont donc actives qu'en présence du GABA : cela explique que l'action sédatrice de ces molécules soit limitée à la quantité de GABA disponible, à la différence des barbituriques qui agissent directement sur le flux des ions chlorure.

Il faut savoir que 40% des neurones du SNC sont GABAergiques, ceci expliquerait l'importance des effets des BZD.

I.3. Psychotropes naturels

Les sédatifs à base de plante constituent une réelle alternative. Ils exercent plutôt un effet calmant et tranquillisant. Dépourvus d'effets secondaires, ils sont tout à fait adaptés pour soulager les troubles mineurs du sommeil d'origine nerveuse et leur prise, même prolongée, ne provoque pas d'accoutumance. Houblon et Valériane sont souvent associés à la passiflore (*Passiflora incarnata* L, passifloracées) utilisée à l'origine dans la médecine traditionnelle nord et sud américaine ou à la mélisse (*Melissa officinalis* L, lamiacées) (Hostettman, 1997). La tradition populaire attribue à plusieurs autres plantes des vertus calmantes sans que l'effet ne soit réellement établi. De nombreuses recherches menées ces dernières années tendent à améliorer la connaissance de l'activité réelle de ces plantes et leurs possibles mécanismes d'actions.

L'effet principal d'une plante sédatif peut être déterminé par des modèles comportementaux, chez les animaux. Le principe est d'observer le comportement de l'animal, qui a reçu la substance, face à différentes situations ainsi que son comportement général.

I.4. Modèles comportementaux

Par définition, un modèle expérimental est une représentation simplifiée d'un processus biologique qui ne peut pas être étudié chez l'Homme soit pour des raisons techniques, économiques ou éthiques. Un modèle animal de comportement essaie de reproduire un symptôme d'un désordre, un groupe de symptômes et même un syndrome. La conception d'un tel modèle peut inclure diverses manipulations comprenant des lésions cérébrales, des élevages sélectifs et l'application d'une diversité de facteurs qui peuvent être impliqués dans l'étiologie du désordre considéré. Ces manipulations conduisent à l'obtention d'un état comportemental qui est utilisé comme un outil pour étudier les différents aspects du désordre modélisé : son étiologie, son traitement et ses bases physiologiques.

Expérimentalement, il n'existe pas de méthodes spécifiques pour la classification des psychotropes. Pour cela il est nécessaires de faire appel à des tests pharmacologiques, pour définir le profil psychopharmacologique des médicaments (effets sédatif, tranquillisant, anxiolytique, et hypnotique) (**Cohen et jacquot, 2008 ; Beaulieu, 2006**). Dans ce sens on distingue des tests comportementaux :

- **Test de la traction**

Le test de la traction proposé par JULOU et COURVOISIER consiste à suspendre des souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement. Une souris normale effectue un rétablissement en moins de **5 secondes**, tout animal qui ne parvient pas à effectuer un rétablissement qui amène au moins une des pattes postérieures à toucher le fil est considéré comme soumis à une action sédatif (**Courvoisier et al., 1957**).

- **Test de la cheminée :**

Dans ce test les souris normales, placées la tête en bas dans un tube de verre de 3 cm de diamètre, sont capables de remonter cette « cheminée » en marchant à reculons, les substances psycholeptiques provoquent la perte de la faculté de remonter (**Boissier et al., 1960**).

- **Test de la planche à trous :**

Le test de la planche à trous a été conçu pour étudier le comportement de la souris confrontée à un nouvel environnement. Ce test permet d'évaluer les effets de drogues psychotropes sur le comportement d'exploration manifesté par l'animal. Il ne prend que quelques minutes et ne nécessite ni conditionnement des animaux ni apprentissage de leur part (**Boissier et al., 1964**).

- **Test de tige tournante « Test du Rota Rod »**

Le Rota Rod a été utilisé au cours de nombreuses études afin de déceler des déficits neurologiques chez les rongeurs, ou pour étudier l'équilibration, mais également dans des travaux ayant pour finalité d'évaluer les capacités d'apprentissage d'un comportement d'équilibration sensori-motrice en situation dynamique (**Krall et al., 1978**).

II. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires

II.1. Inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (figure 1). C'est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : Rougeur, chaleur, douleur, et lésion fonctionnelle énoncés par Aulus Cornelius Celsius. (**Schorderet et al., 1998**).

La réaction inflammatoire met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui interviennent à des temps et des degrés variables : réactions biochimiques, activation cellulaire, coagulation, fibrinolyse et qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère. Cependant une activation trop prolongée ou trop importante peut entraîner des altérations plus ou moins définitives (**Lechat et al., 1990 ; Dieng, 1993**).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire.

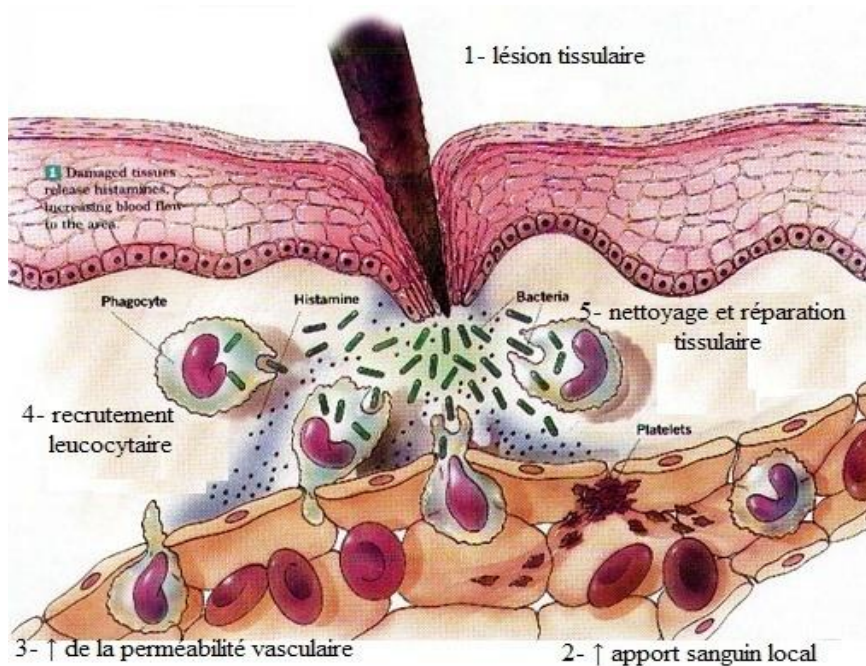


Figure 1 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (<http://www.biologymad.com/Immunology/inflammation.jpg>).

1.1.Causes de l'inflammation

Les causes ou les facteurs qui vont déclencher l'inflammation sont multiples et variées. Elles peuvent avoir diverses origines :

Causes exogènes :

- Agents physiques : traumatisme, radiations, électricité, froid, chaleur, piquûre, coupure ;
- Agents chimiques : acide, base, substances minérales diverses ;
- Agents biologiques : microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon) et d'autres agents comme le vin, le pollen et les toxines. **(Dieng, 1993 ; Bayes, 1997).**

Causes endogènes :

- Causes trophiques: elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation ;
- Conflits immunitaires: rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques **(Revillard, 2001).**

On doit souligner que :

Les micro-organismes infectieux ne constituent qu'une partie des causes de l'inflammation et qu'une réaction inflammatoire n'est donc pas synonyme d'infection.

Un même agent pathogène peut entraîner des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte d'où l'importance des facteurs liés à l'hôte (en particulier l'état des défenses immunitaires). Plusieurs causes peuvent être associées dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

L'inflammation est dite :

- Primaire (ou aiguë) quand elle est de cause immédiate et localisée ;
- Secondaire (ou chronique) lorsqu'elle est plus étendue comme c'est le cas de l'inflammation rhumatismale **(Moulin, 1998 ; Miossec, 2003).**

1.2. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par sa durée limitée dans le temps et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. Elle est dite non-spécifique lorsque l'évènement déclencheur de la réaction inflammatoire est rencontré pour la première fois par l'organisme, et qu'elle ne fait pas intervenir la « mémoire lymphocytaire ». Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. La réaction inflammatoire peut être artificiellement divisée en trois phases (figure 2) :

○ La phase vasculaire et plasmatique

Caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème, un dégagement de chaleur locale. . Il se produit une altération des micros capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine, dérivés du complément) (**Cousins et Poweer, 1999**). Elle est suivie par la formation d'un œdème inflammatoire qui a une double origine. Il est, au début, lié à l'ouverture des sphincters précapillaires ; ouverture qui provoque une élévation de la pression capillaire. Secondairement c'est l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui est en cause. Elle est due à l'histamine qui a une action immédiate mais transitoire. Les lésions de la paroi vasculaire causent une augmentation durable de la perméabilité. Le liquide d'œdème, au cours de l'inflammation, est riche en protéines : il s'agit d'un exsudat.

○ La phase cellulaire

La migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes et la libération de cytokines sont à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération de médiateurs (**Kidd and Urban, 2001**). Dès lors une succession d'évènements au sein de la lésion inflammatoire entraîne : la phagocytose d'agents extérieurs, la captation et la présentation d'antigènes, la production de radicaux libres. Les cytokines en outre agissent au niveau systémique pour augmenter la défense de l'hôte sous forme de fièvre.

○ La phase de régénération

Il débute par une élimination de l'agent causal et des débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire de façon interne (phagocytose, pinocytose) ; externe par les orifices naturels ou par formation d'abcès : artificielle (incision chirurgicale). Puis réparation tissulaire par cicatrisation, qui aboutit à un tissu conjonctif néoformé qui remplace le tissu détruit, ou régénération, lorsque la destruction d'un tissu épithélial est partielle. Le tissu conjonctif est

construit de nouveau par la synthèse de collagène, la multiplication cellulaire (fibroblastes) et la néogénèse vasculaire à partir des capillaires persistants ou localisés en périphérie du site. La surproduction de tissu conjonctif lors de la cicatrisation aboutit à la formation de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes. Un défaut de détersion peut entraîner également une persistance des phénomènes inflammatoires (chronicité) (**Kidd and Urban, 2001 ; Meunier et al., 2004**).

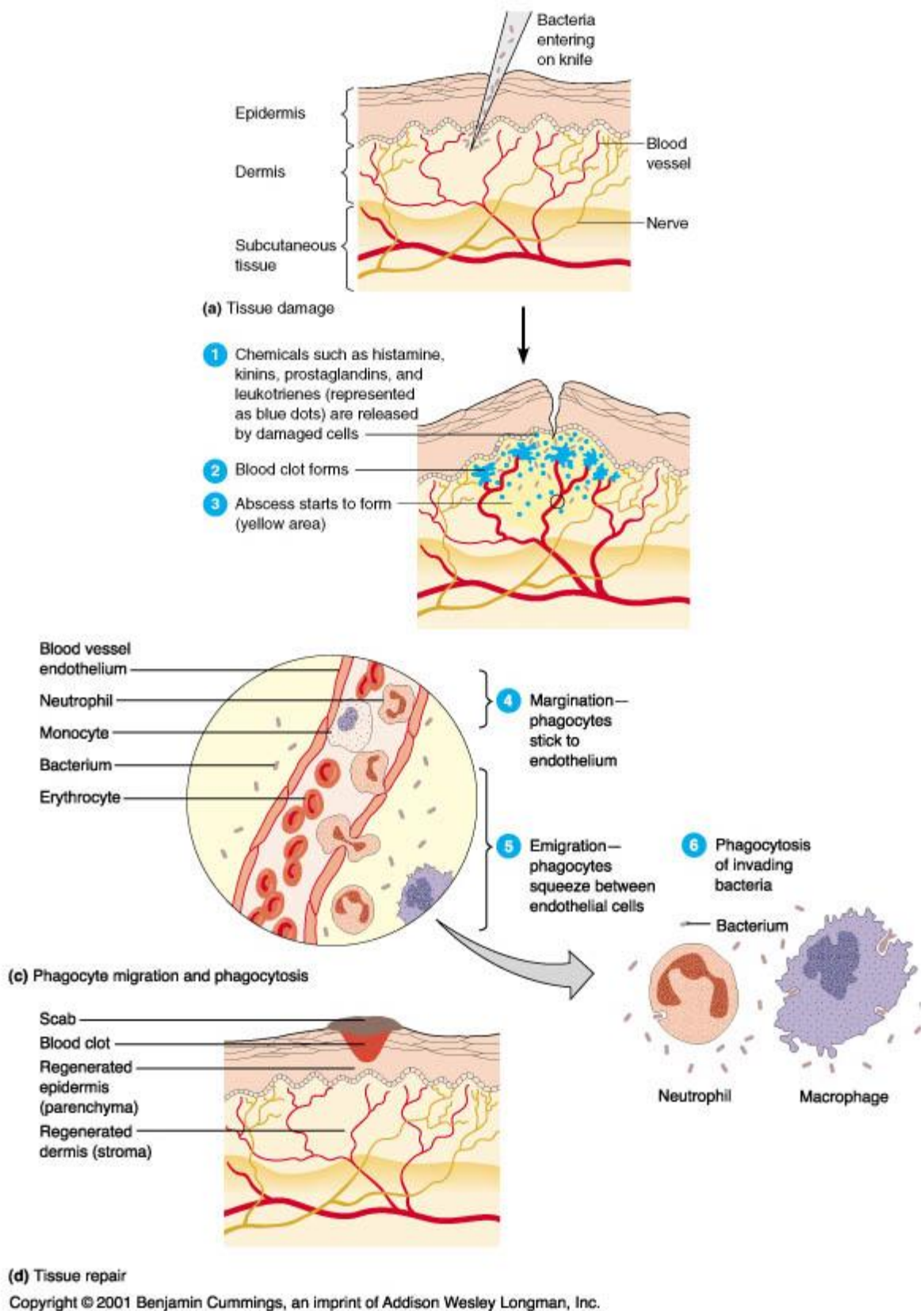


Figure 2 : Les phases de l'inflammation

1.3.Inflammation chronique

L'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Les inflammations chroniques n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques : les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (détersion incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.

Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C).

1.4.Cellules et médiateurs de l'inflammation

Les lésions tissulaires et l'inflammation engendrent la production d'un grand nombre de médiateurs qui, directement ou indirectement, contribuent à la sensibilisation des fibres afférentes périphériques. On parle de « soupe inflammatoire ».

- **Cellules de l'inflammation**

Les polynucléaires neutrophiles : libèrent des protéases, des protéines cationiques, les éicosanoïdes. Ils présentent des récepteurs membranaires responsables de leurs propriétés d'adhérence, de chimiotactisme, de migration, endocytose et phagocytose. Ces polynucléaires neutrophiles sont phagocytés par le macrophage après leur mort sur le site (**Meyer et al., 1994**).

Les phagocytes mononucléés : Les monocytes proviennent de la moelle osseuse, ils ont des rôles d'adsorption et de lyse d'agents pathogènes. Ils assurent également la présentation des antigènes aux lymphocytes, la résorption de substances étrangères et de débris, ils sécrètent des cytokines, participent à l'agression tissulaire par la libération de métabolites de l'oxygène et de protéase. Enfin ils participent à la fibrinogénèse et au remodelage cellulaire par l'apport de collagénase.

Les lymphocytes : ils naissent dans la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang et les tissus lymphoïdes. Ils sont de deux types : les lymphocytes B qui par différenciation donnent naissance aux plasmocytes, producteurs d'immunoglobulines et les lymphocytes T responsables de l'immunité à médiation cellulaire.

A ces cellules s'ajoutent **les polynucléaires éosinophiles**, qui libèrent les dérivés de l'acide arachidonique. **Les mastocytes** qui contiennent de l'histamine et **les cellules endothéliales** qui sécrètent les cytokines, leur multiplication et leur différenciation sont indispensables à l'angiogénèse, facteur clé de réparation tissulaire (**Kidd and Urban, 2001**).

Les fibrinoblastes libèrent la collagénase et **les plaquettes** constituent le lieu de stockage de la sérotonine (**Capron, 1998 ; Diouf, 1991**).

- **Médiateurs de l'inflammation**

- ✓ **Médiateurs cellulaires :**

Les amines vasoactives : il s'agit de sérotonine et l'histamine

* La sérotonine, stockée dans les plaquettes sanguines et dans les cellules chromaffines de la muqueuse intestinale libérée, elle stimule les fibres lisses vasculaires et la disjonction des cellules endothéliales (**Miossec, 2003**).

* L'histamine, libérée à partir des mastocytes et basophiles. Elle est retrouvée au niveau de l'épiderme de la muqueuse gastro-intestinale et du système nerveux. Dans toutes ces cellules, l'histamine se trouve stockée sous forme de complexes protéiques inactifs car elles sont liées à l'héparine. Elle est libérée lors de la dégranulation des cellules phagocytaires et a des propriétés chimiotactiques pour les phagocytes (**Capron, 1998**).

Les prostaglandines et les leucotriènes interviennent dans les processus inflammatoires aigus ou chroniques. Ils sont formés à partir de l'acide arachidonique.

Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimio-attractivité sur les polynucléaires. Les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire, de plus, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine (**Miossec, 2003**).

Les cytokines : Les monokines et lymphokines forment un groupe de protéines jouant un rôle essentiel dans les communications intercellulaires et notamment entre les acteurs du processus inflammatoire. Elles sont sécrétées par les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes et d'autres types cellulaires, telles que les cellules

épithéliales (**Miossec, 2003**). Les cytokines pro-inflammatoires sont essentiellement l'interleukine IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8 et le *tumor necrosis factor* (TNF alpha).

Le PAF acether, phosphoglycéride issu de la dégradation des phospholipides membranaires, est vasodilatateur et augmente la perméabilité capillaire (**Cousins et Poweer, 1999**).

✓ **Médiateurs plasmatiques :**

Kinines plasmatiques : ce sont des polypeptides plasmatiques. Elles sont vasodilatatrices et augmentent la perméabilité vasculaire. Elles favorisent la libération des prostaglandines. Les kinines dont la plus active est la bradykinine qui favorise une vasoconstriction à la base de la stase intracapillaire (**Meyer et al., 1994**).

Le système du complément : intervient dans le phénomène inflammatoire comme dans l'immunité par l'activation des deux voies (classique et alterne). Il entraîne la fixation sur la particule cible de C3 responsable de l'opsonisation et de C5, C6, C7 et C8 qui sont responsables de la lyse avec libération de fragments peptidiques, les anaphylatoxines, ce qui provoque une inflammation locale.

Les facteurs de la coagulation : la fibrine qui sédimente dans le site de l'inflammation à la phase aiguë est le résultat de l'activation de la fibrinogénèse (**Miossec, 2003**).

II.2. Anti-inflammatoires

Le processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments dits anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou traditionnels.

2.1. Anti-inflammatoires conventionnels

Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes, des antihistaminiques (**Yvan, 1997**). Ils sont une classe de médicaments subdivisée en deux catégories.

✓ **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Ils forment un groupe hétérogène de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire quelle que soit son origine (**Yvan, 1997**).

Dans le processus de la réaction inflammatoire, au cours de la phagocytose et de la synthèse des différents dérivés de l'acide arachidonique, il y a une libération de superoxydes à action

pro-inflammatoire d'où l'inflammation. Les AINS inhibent par action sur la cyclooxygénase la synthèse des prostaglandines; et par action sur la lipooxygénase inhibent la formation de superoxydes. Ils ont également la capacité de stabiliser la membrane lysosomiale empêchant ainsi la libération des composés proinflammatoires et d'inhiber l'élaboration des kinines.

Le mode d'action commun de tous les AINS est la diminution de la production de prostaglandines du fait de l'inhibition de la cyclooxygénase. Les prostaglandines sont directement impliquées dans l'inflammation, la douleur et l'hyperthermie (Figure 3).

✓ **Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) de référence (les glucocorticoïdes) sont représentées par la cortisone et l'hydrocortisone. Produits naturels sécrétés par la corticosurrénale; les produits synthétiques.

Ces corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes de l'organisme. Ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique (Figure 5). Par contre ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes.

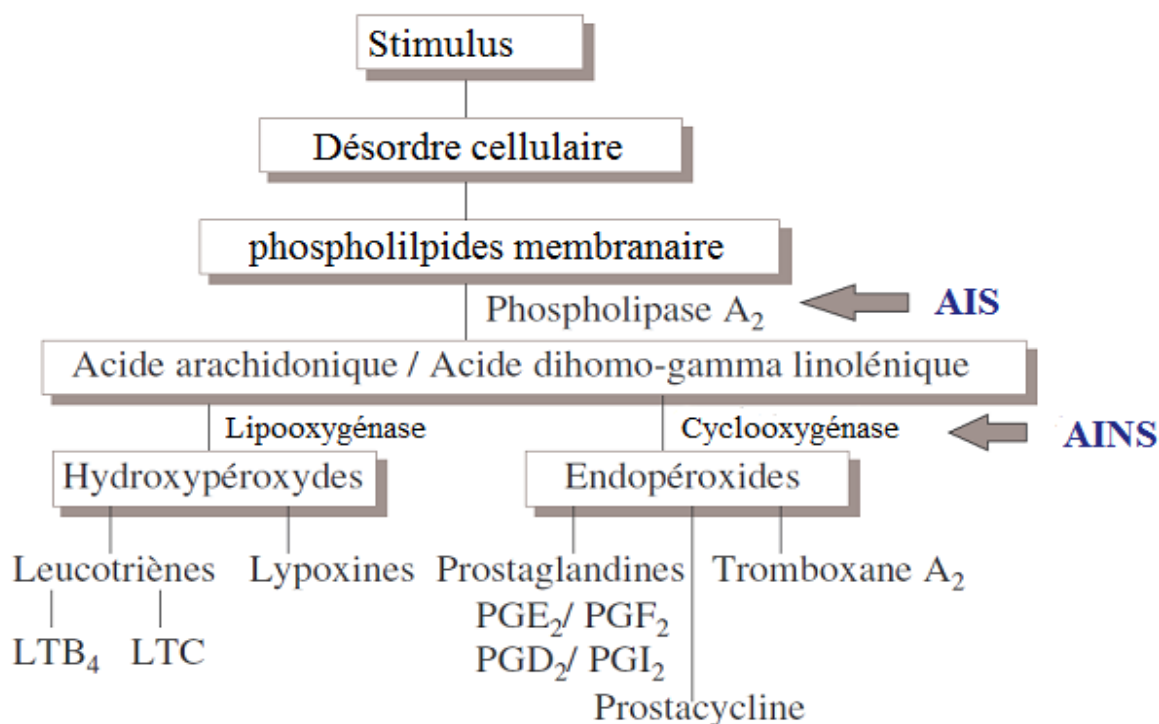


Figure 3 : Cascade arachidonique et site d'action des anti-inflammatoires (Timbo, 2003).

2.2. Anti-inflammatoires traditionnels

L'incorporation et l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement de plusieurs réactions inflammatoires, en particulier le rhumatisme, sont des pratiques communes dans la médecine traditionnelle. Aujourd'hui c'est un fait remarquable que les substances anti-inflammatoires d'origine végétale présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, comme par exemple l'inexistence des effets secondaires.

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipooxygénase ainsi que par d'autres mécanismes.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols de certaines plantes pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) notamment, la phospholipase A2, cyclooxygénase et lipooxygénase. Une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de NO^{*}, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (**Kim et al., 2004**). Des études menées *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibent la production de cytokines telles qu'IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibe la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibe l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes (**Gonzalez-Gallego et al., 2010**). De plus, les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (**Santangelo et al., 2007**). Des études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (**Salas-Salvado et al., 2008**), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes (**Karlsen et al., 2007**) ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma dû à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN (**Nantz et al., 2006**).

II.3. Méthodes de réalisation des tests anti-inflammatoires

Les méthodes d'étude des anti-inflammatoires sont très nombreuses. Après avoir créé l'inflammation sur les animaux de laboratoire, les effets sur les différentes phases de l'inflammation sont recherchés.

- **Inflammation locale de l'oreille :**

L'inflammation de l'oreille de rat, provoquée par l'application locale d'huile de croton peut être réduite par l'application locale de substances anti-inflammatoires (**Van Arman, 1974**).

- **Erythème aux rayons ultraviolets chez le cobaye :**

Il s'agit d'apprécier l'intensité de la coloration rouge de la peau épilée du dos du cobaye soumis aux rayons ultraviolets, en absence puis en présence d'anti-inflammatoires. Ce test peut être effectué sur la souris (**Cohen, 1997**).

- **Perméabilité capillaire chez le lapin :**

L'essence de térébenthine ou l'huile de croton est appliquée sur la peau épilée du lapin albinos. Une exsudation plasmatique est mise en évidence par l'injection intraveineuse de bleu trypan ou de bleu Evans qui se lie aux protéines plasmatiques. L'étendue de la tâche bleu cutanée est proportionnelle à la perméabilité capillaire. L'étendue de la diffusion du bleu dans la substance fondamentale du derme est réduite en présence d'anti-inflammatoires (**Coyen, 1990**).

- **Œdème de la patte de rat :**

L'injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de rat provoque un œdème dont on peut ralentir le développement par un médicament anti-inflammatoire préventif (**Winter et al., 1962**).

L'exsudation est évaluée par le gonflement de la patte postérieure du rat après injection d'un agent phlogogène (formol, olvabumine, carragénine), le diamètre de gonflement est ensuite mesuré à l'aide d'un pied à coulisse où la patte est pesée et son volume est estimé dans un plétysmomètre imaginé par Chevillard et Giano. (**Coyen, 1986**)

Pour notre étude nous avons utilisé cette méthode avec la carragénine comme substance pro-inflammatoire et par un agent physique (le traumatisme).

III. Généralités sur la douleur et les antalgiques

III.1. Définition de la douleur

La douleur est un processus physiologique dont le but est d'avertir la personne d'une menace de son intégrité physique d'où le terme nociception (**Le Bars et al., 2001**). Mais à cette simple transmission du message nociceptif de la périphérie vers les centres corticaux somatosensibles s'ajoute une composante émotionnelle et comportementale. D'où le caractère complexe et multifactoriel de la douleur. La définition actuelle de la notion de la douleur a été rendue officielle par l'I.A.S.P. (International Association for the Study of Pain): « la douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion » (**IASP 2003**). Elle constitue un symptôme, le premier signal d'un phénomène pathologique. Par son intensité et sa durée, elle peut devenir, un véritable syndrome, retentissant sur les grandes fonctions organiques et capable à lui seul d'aggraver de l'état du malade (**Wright., 1973; Benoist et Misset., 1979**). Selon les physiologistes, la douleur est un phénomène pathologique résultant de l'activation des récepteurs nociceptifs par une variété de stimuli douloureux. Elle possède des récepteurs appelés nocicepteurs, des voies de conduction du message nociceptifs et des centres supérieurs (**Besson., 1990**).

Les systèmes nocicepteurs permettent aux organismes pluricellulaires de percevoir des événements extérieurs, mécaniques ou thermiques susceptibles de les endommager, la perception douloureuse joue le rôle d'alarme. Cependant, la manière dont une sensation douloureuse est ressentie en qualité et en intensité demeure subjective, sa perception et son intégration sont complexes et segmentées entre de nombreux étage du système nerveux, de plus c'est un phénomène sensoriel qui intègre une expérience personnelle complexe influencée par un certains nombres de paramètres psychologiques (**Melzack, 1997**).

1.1.Types de douleur

Plusieurs types de douleur peuvent être distingués selon le mécanisme sous jacent (**Guirmand et Le Bars, 1996**). Sur le plan clinique, en fonction de l'origine de la douleur, on parle de:

- ✓ La douleur psychogène d'origine somatique sans cause identifiable pouvant inclure des facteurs neuropsychologiques ;
- ✓ La douleur nociceptive due à l'excitation par des facteurs potentiellement dangereux pour l'organisme des nerfs cutanés ou viscéraux ;

- ✓ La douleur neuropathique due à une lésion primaire, un dysfonctionnement ou une perturbation du tissu nerveux, périphérique ou central.

Sur le plan neurophysiologique, on distingue :

- La douleur aiguë : symptôme d'un traumatisme ou d'une pathologie, elle joue un rôle de signal d'alarme ou de protection ;
- La douleur chronique : dure au-delà de 6 mois, altère la personnalité, n'a pas de fonction biologique, c'est une maladie en elle-même.

Cette classification simple des douleurs fait l'objet d'adaptations constantes tenant compte des mécanismes physiopathologiques impliqués.

1.2. Physiologie de la douleur

La douleur trouve son origine dans la stimulation de différents nocicepteurs correspondant aux extrémités des neurones sensoriels afférents dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale. Il est également nécessaire de rappeler que la douleur représente une modalité sensorielle complexe accompagnée de plusieurs aspects : affectifs et cognitifs et aussi associée à des réponses neurovégétatives (**Almeida et al., 2004**) ; d'où la complexité des différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif. Nous avons décrit les différents systèmes neuroanatomiques impliqués dans la réception, le traitement et la transmission du message nociceptif afférent ; ce qui constitue des éléments fondamentaux pour la perception de la douleur.

- **Les voies périphériques**

Le message nociceptif prend naissance à la périphérie. Il résulte de la mise en jeu de terminaisons libres amyéliniques constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires, ainsi que dans les parois des viscères.

Ce message est transmis à la moelle épinière par les fibres A δ peu myélinisées et C amyéliniques des nerfs périphériques, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions spinaux. Les premières interviennent dans la douleur dite rapide (tolérable et relativement bien localisée de type piqûre), les secondes intéressant la douleur dite lente (intense et diffuse de type brûlure). En plus chez l'Homme en particulier, les sensations douloureuses peuvent être obtenues par stimulation des fibres de gros diamètre Aa et Ce, après blocage des fibres fines A δ et C (**Le Vante et al., 1978 ; Purves et al., 2000**).

- **La moelle épinière**

Les fibres afférentes primaires rejoignent la moelle épinière par les racines postérieures. Le relais médullaire se fait alors avec deux types de neurones : les neurones nociceptifs spécifiques ne véhiculent que des stimuli nociceptifs. Ils sont plus localisés dans les couches superficielles (I et II). Les neurones nociceptifs non spécifiques, appelés aussi ‘neurones convergents’, peuvent véhiculer à la fois des stimuli nocifs ou non. Ils sont localisés dans les couches profondes (V) (**Purves et al., 2000**). Ces neurones peuvent recevoir des influx véhiculés par des fibres fines d’origine cutanée, mais également d’origine viscérale ou musculaire. Cette région spinale est particulièrement riche en récepteur P, considérée comme l’un des neurotransmetteurs essentiels de la sensibilité douloureuse au niveau médullaire (**Pribat, 1980**).

- **Les Voies ascendantes**

Certains neurones se projettent vers l’encéphale, formant ainsi diverse voies ascendantes:

- **Le faisceau spino-thalamique (FST)** chemine au niveau du cordon antéro-latéral de la moelle. Les fibres du FST sont des fibres A-delta, et se projettent dans le thalamus latéral, puis dans le cortex sensitif (voie de la sensation).
- **Le faisceau spino-réticulo-thalamique (FSRT)** chemine aussi au niveau du cordon antéro-latéral de la moelle.

D’autres faisceaux ont été également caractérisés. Citons le **faisceau spino-réticulaire** qui envoie les informations de façon contro-latérale mais également ipsi-latérale en direction des noyaux gigantocellulaires et réticulaires latéral du tronc cérébral. Le **faisceau spinopontomésencéphalique** projette essentiellement sur la substance grise péri-aqueducule et l’aire parabrachiale. Enfin, un **faisceau spino-hypothalamique** qui projette directement sur l’hypothalamus a été récemment décrit (**Brooks et Tracey, 2005**).

- **Les centres supérieurs**

Il n'existe pas dans le cerveau qu'un seul site spécialisé dans la douleur. Les trois principales cibles des messages nociceptifs sont la formation réticulée bulbaire, le mésencéphale et le thalamus latéral (**Willis et Wislund, 1997**).

- **La formation réticulée bulbaire** est la plaque tournante de multiples systèmes : nociception, vigilance, régulation cardiovasculaire et respiratoire, motricité ; c'est aussi le site d'origine de faisceaux descendants bulbospinaux qui modulent la transmission spinale des messages nociceptifs (**Guirimand et Le Bars, 1996**).

- **L'aire parabrachiale et la substance grise périaqueducale** reçoivent des informations nociceptives qui sont ensuite transmises vers l'amygdale et l'hypothalamus ; ceci peut être en rapport avec l'émotion, la peur et le stress liés à la douleur (**Guirimand et Le Bars, 1996**). En effet, des études ont démontré que le noyau central de l'amygdale est impliqué dans le comportement associé à la peur et aux réponses somatomotrices provoquées par le stimulus nocif. De même, plusieurs noyaux hypothalamiques sont également impliqués dans ces réponses comportementales (**Aboufatima et al., 2002 ; Price, 2002**).

- **Le thalamus** reçoit directement ou indirectement les messages nociceptifs intégrés à l'étage spinal. C'est principalement dans le noyau ventro-postéro-latéral du thalamus que sont projetées les afférences nociceptives et de là vers le cortex somatosensoriel primaire et secondaire (S1 et S2). Ces derniers représentent un site critique pour la composante sensoridiscriminative de la douleur (**Price, 2002**). Le thalamus détermine une réaction neurovégétative de défense (accélération cardiaque et respiratoire, trouble vasomoteurs, hypersécrétions glandulaires).

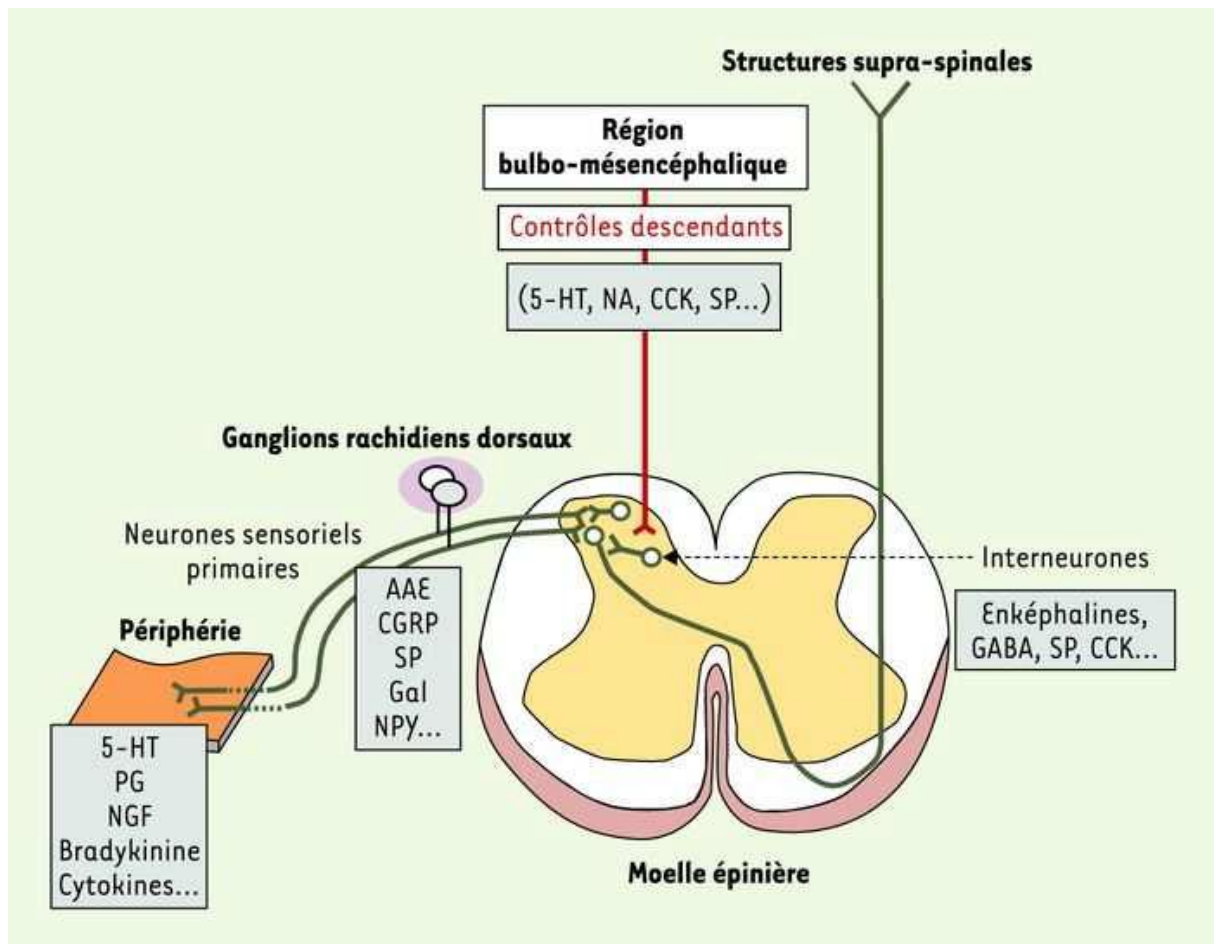


Figure 4 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (D'après Meunier et al., 2004).

III.2. Antalgiques

Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments à action symptomatique qui atténuent ou abolissent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations contrairement aux anesthésiques. Ils sont généralement répartis en deux :

- Les analgésiques morphiniques ou centraux atténuent ou suppriment la douleur d'une façon globale et leur point d'impact est central (thalamique et cortical).
- Les analgésiques non morphiniques.

2.1. Analgésiques morphiniques

L'analgésie morphinique est sélective. Elle supprime les sensations douloureuses, sans altérer les autres sensations en préservant l'état de conscience. Autrement dit elle augmente le seuil de perception de tous les stimuli douloureux. La durée et l'intensité de l'analgésie sont en

rapport direct avec la voie d'administration, la sensibilité individuelle et la dose (au delà d'un seuil les effets toxiques sont majorés).

La morphine soulage bien les douleurs sourdes, les douleurs viscérales et les douleurs aiguës **(Touitou, 1993)**.

Pour expliquer le mécanisme d'action morphinique, il est admis qu'il y aurait une action directe au niveau médullaire sur la transmission de l'influx douloureux et une action indirecte au niveau du tronc cérébral par renforcement des contrôles inhibiteurs sur la conscience et la sensation de la douleur, les régions les plus sensibles sont les structures du cerveau moyen (régions aqueducale et péri-ventriculaire ainsi que le noyau médullaire du raphé).

2.2. Analgésiques non morphiniques

Les analgésiques non morphiniques sont soit seulement sédatifs de la douleur, on les appelle encore antalgiques purs; soit à la fois antalgiques et antipyrétique ou anti-inflammatoire.

Ces médicaments ont une action analgésique beaucoup moins forte que celle des analgésiques centraux comme la morphine. Leurs effets analgésiques se manifestent dans les douleurs peu intenses (céphalées, névralgie, arthralgie, maux de dents...).

Certains sont antipyrétiques, car ils normalisent une température élevée, en agissant sur le centre de la thermorégulation **(Touitou, 1993)**.

III.3. Antalgiques traditionnels

Dans le domaine des analgésiques, les plantes et leurs extraits continueront d'être la source de nouveaux médicaments. Elles sont composées de plusieurs molécules actives agissant souvent en synergie. Chaque famille chimique de principes actifs (flavonoïdes, alcaloïdes, etc) peut avoir un effet pharmacologique différent. La classification par propriété médicinale n'est pas exclusive. Les plantes médicinales qui ont la propriété d'être antalgique ont pour fonction de soulager la douleur. La morphine fait parti des médicaments antalgiques, qui ont été isolée depuis des sources naturelles.

III.4. Méthodes de réalisation des tests antalgiques

Les méthodes d'études des antalgiques sont très nombreux on cite (**Colot, 1972**) :

- **Test de Randall et Selitto**

Il consiste à soumettre à une pression mesurée la patte du rat qui réagit par un cri, l'animal analgésié ne réagit pas.

- **Test d'Amour et Smith**

Il s'agit de focaliser un rayon lumineux calorifique sur la queue de la souris, en moins de 6 secondes la souris déplace la queue. L'animal est considéré analgésié s'il n'y a pas de réponse au bout de 12 secondes.

- **Test à la plaque chauffante ou hot plate test**

Le stimulus est également thermique, la souris est placée sur une plaque à la température de 56°C. Si elle n'est pas analgésiée, elle se lèche la patte en moins de 8 secondes. Les réactions de groupes de souris naïves sont comparées.

- **Test de Charpentier**

La base de la queue du rat est stimulée électriquement, l'animal présente une réaction de fuite avec cris. Le seuil d'intensité de courant électrique déterminant le cri et sa variation après analgésie sont évalués.

- **Test de Tail Flick**

La queue du rat est stimulée par la chaleur, il s'agit d'un appareil constitué d'une ampoule émettant de la chaleur irradiante de 55 à 60 °C. Le seuil d'inhibition de la douleur se situe à 6 secondes, un temps supérieur à 6 secondes révèle une action analgésique centrale type morphine.

- **Test de Koster ou writhing test**

Une solution de phénylbenzoquinone ou d'acide acétique à 3 % est injectée par la voie intrapéritonéale à la souris ou au rat. Sur des groupes d'animaux la dose analgésique empêchant le phénomène de torsion induit par le stimulus chimique est déterminée.

Dans notre étude nous avons utilisé cette méthode avec l'acide acétique à 3 % et la méthode de test Tail Flick.

Généralités sur les Activités biologiques étudiées *in vitro*

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (**Bandoniene et al., 2000**).

I. Stress oxydatif et les antioxydants

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps, en les abîmant et en accélérant le processus de vieillissement. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé stress oxydatif. (**Yepez et al., 2002**).

I.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération de radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd et al., 2003**). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**). Dans les systèmes vivants, une production physiologique de radicaux libres se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces réactifs est possible. Ce sont les antioxydants qui peuvent empêcher les dégâts cellulaires causés par les radicaux libres de l'oxygène (**Valko et al., 2007**).

I.2. Antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant toute substance susceptible d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène (**Favier, 2003**). Ils peuvent agir en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux

libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres. (**Ribeiro et al., 2001**)

D'un point de vue biologique, les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive, ils sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes (**Hale, 2003**).

Outre les antioxydants produits par l'organisme pour sa défense, Il existe des antioxydants synthétiques. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisol butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), etc. (**Ribeiro et al., 2001 ; Marongiu et al., 2004**). Le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants synthétiques (maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets indésirables sur la santé humaine) impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine (**Herodez et al., 2003**). Les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels (**Ribeiro et al., 2001 ; Marongiu et al., 2004**).

I.3. Antioxydants naturels

Les plantes constituent une source importante d'antioxydants, ces substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif dû aux effets synergiques ou additifs (**Pratt, 1980; Moure et al., 2001**). Les chercheurs s'intéressent en effet très particulièrement aux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes (**Potterat, 1997**). L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour préserver les aliments. De plus, il a été démontré que plusieurs produits naturels (antioxydants) avaient des propriétés médicinales, par exemple : anti-cancérigène, anti-inflammatoire (**Madhavi et al., 1995**).

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les plantes supérieures et dans toutes les parties de la plante. Les flavonoïdes constituent la classe la plus étudiée, la propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger le radical libre : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C₃OH) fortement réactif (**Ghedira, 2005**). Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique.

I.4. Evaluation de la capacité antioxydante par les tests in Vitro

A cause de la propriété essentielle de l'antioxydant (piégeur des radicaux libres), plusieurs méthodes ont été mises en évidence pour évaluer l'efficacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres (ABTS, DPPH, FRAP).

- **Test DPPH**

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée in vitro par le 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dont le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée photométrable à 517 nm. La réduction du radical par un donneur d'atome d'hydrogène conduit à la formation de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine DPPH de coloration jaune-verte. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

- **Test ABTS**

La capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC) ou le test de décoloration ABTS+. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique ABTS+ (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de coloration bleue-verte en ABTS incolore, par le transfert d'un électron singlet par l'antioxydant. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO₂, **Miller et al., 1996**), la metmyoglobine (**Miller et al., 1993**), le peroxyde d'oxygène (H₂O₂ ; **Cano et al., 2002**) ou le persulfate de potassium (**Re et al., 1999**).

- **Test FRAP**

Le test de la réduction du fer est considéré comme un test direct et rapide. Il est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques, et déterminer l'activité antioxydante des extraits étudiés dans un milieu neutre (**Oyaizu, 1986**). Ce test est basé sur la réduction des ions [Fe (CN)₆]³⁻ (Ferricyanure) à des ions de [Fe (CN)₆]⁴⁻ (ferrocyanure) qui donne en présence des ions Fe²⁺ une coloration bleu clair, mesurable à la longueur d'onde 700 nm.

II. Généralités sur les bactéries et les antibiotiques

II.1. Définition des bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique. (Nauciel et Vildé, 2005).

II.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (Nauciel et Vildé, 2005).

Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température, rayonnements...), les agents chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés, alcools...) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales. Mais il y a d'autres agents, possédant une "*toxicité sélective*": ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "**Antibiotiques**" (Leclerc et al., 1995).

II.3. Antibiotiques

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries) (**Khiati, 1998**), dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme (**Garnier Delamare, 1992**) ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier [**Berche et al., 1989**], mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales (**Leclerc et al., 1995**). Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons, s'est élargi plus tard et comprend actuellement d'autres produits possédant la même action antibactérienne, mais obtenus par synthèse (**Garnier Delamare, 1992**).

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolis, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes) les bêtalactamines, les aminosides, les polypeptides (**Garnier Delamare, 1992 ; Khiati, 1998**). Chaque antibiotique possède un spectre d'action, qui est la flore microbienne sur laquelle il exerce son activité bactéricide ou bactériostatique, il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre (**Garnier Delamare, 1992**).

Ainsi, les antibiotiques ont été classés (**Dupont et Drouhet, 1987; Leminor et Veron, 1989**) selon leur mode d'action en:

- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses du peptidoglycane.
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.

L'utilisation intense et abusive de ces produits a rapidement conduit à l'apparition des deux phénomènes importants: les effets secondaires dûs aux médicaments et l'acquisition d'une certaine résistance aux antibiotiques par certaines populations microbiennes.

En raison des résistances multiples possibles et des effets secondaires des antibiotiques synthétiques, une attention croissante a été dirigée vers les antibiotiques naturels (**Namiki, 1990**). Les chercheurs concentrent leurs efforts pour trouver des substances inhibitrices idéales, de large spectre d'activité, sans effets secondaires et surtout d'un prix de revient raisonnable. Le potentiel des plantes aromatiques et médicinales (PAM) pourrait donc jouer un rôle important dans la lutte contre les infections microbiennes.

II.4. Antibiotiques traditionnels

A côté des antibiotiques d'origine microbienne (**Paris and Moyses, 1965**), les plantes et leurs extraits ont été utilisés pendant plusieurs siècles comme remèdes pour la cure ou l'allègement des maladies. Ceci a ouvert la voie devant de nombreuses recherches qui ont montré, qu'effectivement, plusieurs végétaux supérieurs renferment des agents antimicrobiens très efficaces (**Mitsher et al., 1972 ; Leven et al., 1979 ; Matasyoh et al., 2009**). Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe poivrée (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (**Huang et al., 2008**).

Étant donné le grand nombre de composants présents dans un extrait, il est évident que l'activité antibactérienne ne peut être due à un seul mécanisme d'action spécifique mais plutôt à divers mécanismes (**Burt, 2004**).

Ces mécanismes sont la conséquence de l'action d'extrait à différents points de la cellule. Plusieurs études montrent que la membrane des cellules bactériennes est la cible primaire des composés aromatiques bioactifs. En effet une caractéristique importante des extraits fixes et de leurs composants est leur hydrophobicité, qui leur permet de s'unir aux lipides de la membrane cellulaire tout en changeant sa structure et par conséquent sa fonction. La perte du caractère différentiel de la perméabilité de la membrane cytoplasmique est fréquemment identifiée comme étant la cause de la mort cellulaire. Toutefois, certains auteurs voient que la perte des fonctions de la membrane explique seulement en partie l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (**Walsh et al., 2003**).

Les composants des huiles essentielles peuvent aussi agir sur les protéines membranaires. Ils sont capables de s'accumuler dans la couche lipidique et interférer avec l'interaction lipide-protéine. De plus, une interaction directe entre les composés lipophiles et la partie hydrophobe de la protéine peut avoir lieu (**Juven et al., 1994**).

II.5. Description des bactéries étudiées

a- *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (**Patrick et al., 1988**), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (**Steven et al., 2004**).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. *E coli* est le germe responsable de 75 à 80 % des infections urinaires. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (**Patrick et al., 1988**).

b- *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis, est un germe responsable des infections urinaires, il favorise la lithogénèse dans les voies urinaires et c'est un pathogène difficile à éradiquer (**Kernbaun, 1980**)

c- *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires (**Richard et Kiredjian, 1995**).

d- *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin).

S. aureus est un pathogène important, responsable des infections des plaies, de l'ostéomyélite de l'enfant (infection de l'os), de l'arthrite (infection d'une articulation), septicémie et pneumopathies (multiples petits abcès des deux poumons) (**Hart and Shears, 1997**).

Une toxi-infection alimentaire, avec diarrhée et vomissements rapidement régressifs, est parfois provoquée par le staphylocoque (surtout par sa toxine). Les staphylocoques peuvent causer des lésions très diverses, mais les atteintes cutanées sont les plus fréquentes.

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIEL ET MÉTHODES



Extraction et Criblage phytochimique

Extraction et Criblage phytochimique

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique des extraits aqueux et des huiles essentielles des deux espèces. Il s'agit notamment de : *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*.

Cette investigation phytochimique comporte :

- * L'extraction par l'eau de la matière sèche de la partie aérienne des espèces étudiées.
- *Le criblage (screening) phytochimique, réalisé afin d'avoir une idée sur la nature des composés qui sont présents dans les extraits aqueux testés.
- *Enfin, l'extraction et l'identification chimique de l'huile essentielle des deux plantes étudiées.

I. Matériel végétal

Les espèces (*Melissa officinalis* L. et *Mentha rotundifolia* L.) ont été collectées dans leurs habitats naturels entre le mois de janvier et février 2012 pour *M. officinalis* autour de la région d'El-jadida tandis que *M. rotundifolia* a été récoltée en mois de juillet 2013 de la région de Rabat. Ces espèces ont été identifiées par un botaniste dans le département des plantes aromatiques et médicinales à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Rabat. *Melissa officinalis* L. est déposées dans l'herbier du département de botanique à l'Institut Scientifique de Rabat, spécimen RAB 76712.

Après séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal de chacune des deux espèces est broyé grossièrement dans un moulin électrique pour préparer l'extrait aqueux. Alors que, pour la préparation de l'huile essentielle on a utilisée la plante fraîche.

II. Préparation des extraits

S'inspirant des méthodes traditionnelles, nous avons préparé un extrait aqueux des deux espèces *Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*. En parallèle, nous avons réalisé des extractions des huiles essentielles par hydrodistillation.

II.1. Préparation de l'extrait aqueux

On a effectué un broyage de la partie aérienne des plantes à l'aide d'un moulin électrique de manière à obtenir une poudre fine et homogène. Cent grammes de poudre de chacune des plantes ont été portés à ébullition pendant 20 minutes dans 1000 ml d'eau distillée puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. Le macéré a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre (papier Whatman n°1) puis évaporé sous vide et séché jusqu'à poids constant du résidu (**Loubaki , 1999**).

II.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Une fois que la matière végétale est récoltée, la partie aérienne de la plante est récupérée et nettoyée de la terre et des autres herbes contaminants. Nous avons introduit 200 g de la partie aérienne avec 3 litres d'eau distillée, puis chauffé pendant 3 heures. (Photo.3) Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et se séparent en deux phases liquides ; une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase organique constituée par l'huile essentielle. A la fin de l'hydrodistillation, l'huile essentielle de couleur jaune est récupérée dans un récipient, et mise dans un tube taré afin de calculer le rendement. Et conservée à +4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur usage (**Chanthaphon et al., 2008 ; Ayoughi et al., 2011**) .



Photo 3 : Montage d'Hydrodistillation de la plante (Clevenger)

II.3. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

III. Criblage phytochimique des extraits aqueux

Les extraits aqueux obtenus ont servi à la réalisation d'un screening phytochimique préliminaire, il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites dans les travaux de (**Ronchetti et Russo, 1971 ; Hegnauer, 1973 ; Wagner et Bladt, 2001 ; Békro et al., 2007**).

III.1. Détection des stérols et des polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, nous avons utilisé le réactif de LIEBERMANN. En effet, 1 mg de chacun des deux extraits aqueux est dissout à chaud dans 1ml d'anhydride acétique puis nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

III.2. Détection des polyphénols

Les polyphénols ont été mis en évidence par la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3). à 2 ml de chaque extrait, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée.

III.3. Détection des flavonoïdes

Pour mettre en évidence les flavonoïdes, la réaction dite "la cyanidine" a été utilisée. 10 mg de chaque extrait a été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose-orangée ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes.

III.4. Détection des tannins

- les tannins catéchiques sont identifiés par le réactif de STIASNY (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). 15 ml du réactif de STIASNY a été ajouté aux extraits, le mélange a été maintenu au bain- marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques.

- les tannins galliques sont identifiés par ajout de FeCl_3 . En effet, nous avons filtré 5 ml de chaque extrait aqueux. Le filtrat est recueilli et saturé par l'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl_3 à 2% provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense dénotant la présence de tanins galliques.

III.5. Détection des Quinones

Pour mettre en évidence les Quinones, nous avons utilisé le réactif de BORNTAEGEN. En effet, un aliquote de résidu dissout dans 5 ml d'acide chlorhydrique au 1/5, est chauffée au bain-marie pendant 30 min.

Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. 0.5 ml de l'ammoniac dilué 2 fois a été ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violet constituait le signe de la présence de quinones.

III.6. Détection des alcaloïdes

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de DRAGENDORFF (réactif de l'iodobismuthate) et de BURCHARD (réactif iodoioduré) ont été utilisés. 0.1 g de chaque extrait est repris dans 6 ml d'éthanol à 60%, puis réparti dans 2 tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité ou une coloration orangée indique un test positif. L'ajout de 2 gouttes du réactif de Burchard dans le deuxième tube provoque un précipité de coloration brun-rougeâtre et indiquant une réaction positive.

III.7. Détection des saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes (s) puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

III.8. Détection des Anthocyanes

Pour mettre en évidence la présence des anthocyanes, nous avons introduit a 5 ml de l'extrait, 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH_4OH . Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

III.9. Détection des dérivés anthracéniques

On retrouve les dérivés anthracéniques dans les plantes, sous forme d'aglycone libre ou sous forme combinée d'hétérosides anthracéniques. La présence de dérivés anthracéniques est mise en évidence à l'aide d'une solution de NH_4OH diluée à 50%.

A 1 g de drogue en poudre, on ajoute 10 ml de chloroforme et on chauffe au bain-marie pendant 3 min, après filtration à chaud on complète à 10 ml avec de l'eau distillée.

A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, on ajoute 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le tube à essai est maintenu dans le bain-marie bouillant pendant 15 min. Après refroidissement sous un courant d'eau et filtration, on complète à 10 ml avec de l'eau distillée.

- 1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH_4OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.
- 5 ml d'hydrolysate + 5 ml de chloroforme et agité, à la phase organique, introduit dans un tube à essai, on ajoute 1 ml de NH_4OH dilué, la présence d'anthraquinones est révélée par une coloration rouge plus ou moins intense.

IV. Dosage phytochimique des extraits

L'analyse quantitative des extraits des deux plantes nous permet d'avoir une estimation sur la teneur des phénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits. La concentration des phénols totaux a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (**Lister et Wilson, 2001**), et les flavonoïdes ont été quantifiés par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de (**Dewanto et al, 2002**).

IV.1. Dosage des polyphénols

La teneur des phénols a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Ciocalteu (**Lister et Wilson, 2001**), le réactif de couleur jaune est constitué d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Dans un tube à essai introduire 0.5 ml de l'extrait et 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10 avec de l'eau distillée. Le milieu est agité à l'aide d'un vortex, puis nous avons ajouté 4 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7.5%). Le mélange est ensuite incubé dans un bain mari à 45° C pendant 30 minutes et l'absorbance est lue à 765 nm par spectrophotométrie UV-Vis-2450 SHIMADZU contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 1 gramme d'extrait (mg EAG / 1 g Ex).

IV.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes a été effectuée selon la méthode décrite par (**Dewanto et al., 2002**) avec le réactif de trichlorure d'aluminium AlCl_3 et la soude NaOH . Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm.

1 ml de chaque extrait a été introduit dans une fiole jaugée de 10 ml avec de l'eau distillée pour obtenir un volume total de 5 ml, puis 0.3 ml de NaNO_2 à 5% a été ajouté. Après cinq minutes, 0.3 ml d' AlCl_3 à 10% a été ajouté et le mélange est laissé au repos. Après six minutes, 2 ml de NaOH 1M a été ajouté et le volume total est complété à 10 ml avec de l'eau distillé. Puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue immédiatement à 510 nm contre le témoin.

La teneur en flavonoïdes totaux dans chaque extrait a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standards de la Rutine établie dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Elle est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes d'équivalents de rutine par 1 gramme d'extrait (mg ER / g de l'extrait).

V. Analyse des huiles essentielles

Les échantillons des huiles essentielles des deux espèces ont été analysés au moyen d'un chromatographe à phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Trace GC ULTRA couplé à un spectromètre de masse de type *Polaris Q MS* à trappe ionique. L'appareil est équipé d'une colonne de type VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), longueur de 30 m et de 0.25 mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0.25 μm . le programme de température appliquée est de 40° C pendant 2 minutes, une montée de 40 à 180°C à raison de 4° C/min, de 180°C à 300°C à 20° C/min puis un maintien à 300° C pendant 2 minutes. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1.4 ml/min. l'injection se fait par mode split, la température d'injection est de 220° C et celle de l'interface est de 300° C. La quantité de l'huile essentielle injectée est de 1 μl . Les spectres ont été enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la gamme de masse balayée est de 50 à 350 uma. La température de la source est de 200 °C.

Les différents constituants des huiles essentielles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés des bases de données NIST 2005 et WILEY (275L) et confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature (**Kondjoyan et Bergdaque, 1996; Adams, 2001**).

Étude Toxicologique

Étude toxicologique

Les études de toxicologie expérimentale d'un produit pressenti en devenir d'un médicament comportent l'appréciation de :

- Toxicité aigue par administration unique.
- Toxicité chronique par administration réitérée.
- La recherche de potentialités toxiques pour l'ADN (mutagenèse, cancérogenèse).
- L'étude de la toxicité pour l'embryon et le fœtus.

La toxicité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aigue après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance.

Notre étude consiste en l'évaluation de la toxicité aigue des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*. Ainsi, l'étude de la toxicité chronique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*.

La première étape dans la recherche pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier la toxicité aigue. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à tester la toxicité aigue, par voie orale, car c'est la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour l'Homme, des extraits aqueux et des huiles essentielles des deux espèces chez la souris selon la ligne directrice de L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) code 423.

I. Etude de la toxicité aigue des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*

Nous avons investigué la toxicité aiguë des extraits aqueux et des huiles essentielles des deux espèces conformément à la méthode de toxicité aigue orale décrite dans la ligne directrice OCDE 423 (OCDE, 2002).

Cette méthode est reproductible, utilise très peu d'animaux et différente des autres méthodes de toxicité aiguë (Lignes directrices 420 et 425). Elle permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux.

L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire:

- Arrêt de l'essai,
- Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

L'expérience est effectuée pour chaque étape sur trois souris suisses femelles non gravides, âgées de 2 à 2.5 mois, leur poids se situe entre 20 et 30 g, ces souris sont gardés sains et à jeun (on supprime la nourriture mais pas l'eau) 4 h avant et 2 h après l'administration orale des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*, la dose initial choisi est de 300 mg/kg. Ces animaux proviennent de l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, elles sont maintenues dans des conditions de température 22°C (± 3), de taux d'humidité 30-70 % et d'éclairage 12 heure lumière et 12 heure obscurité.

L'extrait aqueux est administré en solution dans l'eau distillée et l'huile essentielle est administrée en solution dans l'huile d'arachide par voie orale, sous un volume de 0.5 ml pour 20 g de poids corporel. Les souris traitées sont gardées en observation de façon continue le jour de gavage pour noter toute perturbation immédiate. L'observation des variations de poids, de taux de mortalité, de comportement de l'animal et des signes de toxicité est réalisée également durant les 14 jours qui suivent l'exposition pour déceler d'éventuels effets retardés des extraits.

Après la détermination de la toxicité aigue des extraits des deux espèces (*Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*), nous avons testé l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* pour une administration répétée durant 90 jours c'est la toxicité subchronique selon la ligne directrice de l'OCDE 408.

II. Etude de la toxicité chronique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*

La toxicité chronique est l'étude de l'effet d'une substance quelconque sur des animaux de laboratoire auxquels on administre une dose de façon réitérée, pendant une période de 3 mois.

L'étude de la toxicité chronique permet :

- D'évaluer la toxicité d'une substance administrée à plusieurs reprises, cette toxicité résulte du produit lui-même et/ou de ses métabolites.
- De mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par l'administration réitérée et établir leur apparition en fonction de la posologie.
- De définir les limites de l'innocuité expérimentale.
- D'apprécier le degré de réversibilité des effets toxiques.

II.1. Extraits testé

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* en solution dans l'huile d'arachide (100 et 200 mg/kg ; VO). Et l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* est dissout dans de l'eau distillée pour obtenir les doses de 300 et 600 mg/kg qui sont administrées au volume de 1 ml / 100 g de poids corporel des rats.

Les doses utilisées sont inférieures à la DL₅₀, et n'ont pas causées la mort d'animaux lors de l'étude de la toxicité aiguë sur les souris. Pour ce faire, nous avons travaillé avec des doses correspondant au un dixième de la DL₅₀, soit 100 et 200 mg/kg pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et 300 et 600 mg/kg pour l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*.

II.2. Animaux

Les rats de souche Wistar utilisés proviennent de l'élevage de l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat. Ils ont été répartis en 6 lots de 12 rats, chaque lot est homogène formé de 6 mâles et 6 femelles, mis séparément dans des cages (les femelles séparées des mâles). Les rats pesant entre 180 et 200 grammes et sont préalablement marqués et gardés sous conditions standards (22 ± 3° C; 12/12 h cycle lumière/obscurité). Tous les animaux avaient un accès libre à l'eau. Ils ont été acclimatés pendant 5 jours avant le début de l'étude.

II.3. Test de la toxicité chronique

La toxicité chronique par voie orale a été réalisée selon la ligne directrice de l'OCDE 408 et 452 pendant 90 jours. Deux lots servent de lot témoin ; le premier reçoit de l'eau distillée puisqu'elle est le véhicule pour l'extrait aqueux et le deuxième reçoit de l'huile d'arachide pour l'extrait de l'huile essentielle. Les 4 autres lots sont les lots d'animaux traités avec les extraits à tester. Pendant toute la période d'exposition, nous avons suivi leur poids corporel par la pesée chaque semaine et noté leur comportement. Et afin d'évaluer l'impact des extraits sur certains organes et sur le métabolisme des animaux, nous avons réalisé des prélèvements sanguins en vue d'effectuer des tests hématologiques et biochimiques en relations avec la fonction hématologique, hépatique et rénale. Les prélèvements sanguins ont été effectués, en quatre temps différents ; T₀: Prélèvement témoin, avant le traitement. T₁, T₂ et T₃ après chaque 30 jour de traitement.

Les rats sont mis à jeun pendant une nuit et les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une pipette pasteur héparinée à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil après une légère anesthésie à l'éther. Le sang est prélevé sur EDTA (pour les paramètres hématologiques), et sur tube hépariné (pour le bilan biochimique) en vue de l'analyse des paramètres biochimiques et hématologiques.

A partir de ces prélèvements, les paramètres suivants ont été déterminés :

3.1. Paramètres biochimiques

Les tubes héparinés sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 10 min. Le sérum préparé à partir de ces échantillons pour déterminer les paramètres biochimiques suivants : Glucose, Créatinine, Urée, Alanine aminotransférase (ALAT) et Aspartate aminotransférase (ASAT).

3.2. Paramètres hématologiques

Les échantillons de sang prélevés sur EDTA ont été immédiatement utilisés pour déterminer les taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes, de la formule leucocytaire, de l'hémoglobine et de l'hématocrite.

Les dosages (hématologique et biochimique) ont été réalisés au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire, IBN Sina de Rabat.

A la fin de test, tous les animaux survivants ont été sacrifiés après anesthésie avec l'éther. Le cœur, les poumons, le foie, les reins, et la rate sont prélevés pour réaliser des analyses histopathologiques. Ces dernières ont consistées pour la recherche d'éventuelles conséquences lésionnelles du traitement sur ces organes, par des analyses macroscopiques et microscopiques. Une fois l'organe prélevé, il était pesé et conservé dans un flacon contenant le formol à 10% afin d'éviter sa dessiccation. Chaque organe a fait l'objet d'une analyse microscopique.

Les analyses histopathologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomopathologie du Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital des enfants-Rabat.

Activités *in Vivo* des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*

I. Activité psychotrope

La détermination du profil psychopharmacologique d'une substance donnée, nécessite l'utilisation d'une batterie de tests pharmacologiques, étant donné qu'il n'existe pas de méthodes spécifiques pour une classe pharmacologique donnée. En fonction des résultats obtenus sur la base de différents tests, on définira le profil psychopharmacologique d'une substance et au terme de ces études, une idée sur son utilisation clinique potentielle sera émise (**Cohen et jacquot, 2008 ; Beaulieu, 2006**).

Les méthodes d'étude sont classées en 3 groupes :

- Méthodes comportementales : étude de la réponse de l'animal à l'administration de la molécule à l'aide de différents tests comportementaux.
- Méthodes neurochimiques : recueil de dialysats et mesure des concentrations en neurotransmetteurs et ses métabolites ; étude de la liaison sur les récepteurs et les transporteurs.
- Méthodes électrophysiologiques : enregistrement de l'activité électrique des neurones, on a souvent recourt à l'EEG (électroencéphalogramme) et les autres enregistrements polygraphiques, permettant d'apprécier l'activité d'une substance sur le système nerveux.

Ces trois méthodes sont complémentaires dans la définition du profil psychopharmacologique d'une substance.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les méthodes comportementales pour évaluer l'activité psychotrope de nos extraits.

I.1 Test de la traction

Cette méthode teste le reflexe de rééquilibration de l'animal. Il consiste à suspendre la souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement, et on compte le temps mis par la souris pour amener au moins une des pattes postérieure à toucher le fil. Une souris normale effectue un rétablissement en moins de 5 secondes.



Photo 4 : Dispositif de la traction

I.2. Test de la cheminée

Cet essai, évaluant l'exploration et le désir de fuite, consiste à placer une souris dans une éprouvette de 2 L dont la tête est en bas ; on note le temps mit par la souris pour sortir à reculons, les souris sont en sédation si le temps dépasse 30 secondes.



Photo 5 : Dispositif de la cheminée

I.3. Test de la planche à trous

Ce test est conçu pour étudier le comportement de la souris confrontée à un nouvel environnement. Il permet de mettre en évidence l'action inhibitrice des psycholeptiques sur une des composantes du comportement d'investigation, la réaction d'exploration, réaction en rapport à la fois avec la curiosité et avec le désir de fuite de l'animal. Pour ce faire, on utilise l'appareil de planche à trous model **LE-8825**, la planche mesure 40 cm x 40 cm par 2.2 cm d'épaisseur et comporte 16 trous de 3 cm de diamètre régulièrement espacés. Elle est faite en Perspex gris de finition matte pour éviter les reflets pouvant perturber le comportement de la souris. Les mouvements d'exploration des trous sont automatiquement détectés par des cellules infrarouges. Des émetteurs et des récepteurs miniatures à IR sont incorporés dans les parois de chaque trou. L'unité de contrôle affiche les résultats sur un écran LCD. Toutes les

souris sont maintenues dans leurs cages jusqu'au 30 minutes après l'administration de l'huile essentielle (100, 200, 400 et 500 mg/kg ; VO) et l'extrait aqueux (200, 400 et 600 mg/kg ; VO) des deux plantes, cette propriété permet aux souris de ne pas acquérir une curiosité avant le test. Le comptage du nombre de trous explorés est révélé au bout de chaque minute pendant 5 min; (les moyennes sont calculées pour chaque minute et pour l'ensemble des 5 minutes). Pendant toute la durée de l'essai, l'observateur doivent être rigoureusement silencieux et immobile (**Boissier et al., 1964**).



Photo 6 : Dispositif de la planche à trous

I.4. Test Rota-Rod

Le Rotarod est une méthode de test simple pour la coordination motrice des rongeurs. Ainsi, le rotarod est un dispositif qui a été utilisé au cours de nombreuses études afin de déceler des déficits neurologiques chez les rats ou les souris, ou pour étudier l'équilibration chez le rat (**Clark, 1974**), mais également dans des travaux ayant pour finalité d'évaluer les capacités d'apprentissage d'un comportement d'équilibration sensori-motrice en situation dynamique (**Auvray et al., 1989; Caston et al., 1995; Lalonde et al., 1996; Le Marec et al., 1997**). Ce test est réalisé par un appareil « LE 8500 Rota Rod / RS » se composant d'un mât en Perspex, horizontal, de 50 centimètres de long et de 3 centimètres de diamètre ; fournissant un grip optimal pour les rongeurs. Des cloisons verticales permettent de délimiter quatre compartiments isolés afin de soumettre simultanément quatre animaux au test. Ce mât est situé à 25 cm au-dessus de palettes montées sur un axe permettant leur inclinaison et l'arrêt du décompte du temps lors de la chute de l'animal. Ce mât tourne librement autour de son axe longitudinal grâce à un moteur à courant continu. La vitesse de rotation de l'axe peut être modifiée dans une plage allant de 4 à 40 rpm et possible de l'utiliser avec une vitesse de rotation constante (**Crawley J.N., 1999**). La veille du test de Rota Rod, les souris sont soumises à un pré-test qui consiste à les placer à une vitesse de 12 tours par minute afin de sélectionner celles qui resteront au moins 60 secondes sur la barre.

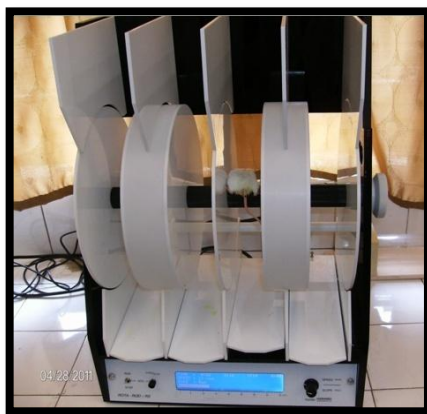


Photo 7 : Dispositif de la tige tournante

Le jour qui suit, les extraits sont injectés aux souris présélectionnées 30 minutes avant le test. L'incapacité motrice est évaluée à 30, 60, et 120 minutes après l'administration orale de l'huile essentielle (100, 200, 400 et 500 mg/kg ; VO) et (200, 400 et 600 mg/kg ; VO) pour l'extrait aqueux des deux plantes. Le temps mis par les souris avant de tomber du Rota-Rod est enregistré.

Pour chaque test, trois lots de 5 souris sont utilisés :

Lot témoin recevant le solvant de l'extrait;

Lot de référence recevant le Bromozepam (20 mg/kg) ;

Lots traité par les extraits.

II. Activité Anti-inflammatoire

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. C'est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction (quadrilatère de Celse). Elle peut être aiguë, subaiguë ou chronique. Ce processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments dits anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou traditionnels.

L'inflammation est généralement associée à la douleur comme un processus secondaire résultant de la libération de médiateurs algiques comme les kinines, les produits de la cyclooxygénase et les cytokines (**Queiroz et al., 2010**).

Des études ont été poursuivies sur les maladies inflammatoires et les effets secondaires des médicaments anti-inflammatoires actuellement disponibles représentent un problème majeur au cours de leur utilisation clinique (**Panda et al., 2009; Kayaalp, 1998**).

Par conséquent, le développement de nouveaux anti-inflammatoires plus puissants avec moins d'effets secondaires est nécessaire. Les plantes médicinales sont largement utilisées dans le monde entier par la population et se sont révélées être une riche source de nouveaux composés actifs, en particulier pour traiter les processus de la douleur et l'inflammation.

Le traitement d'une variété de maladies avec des extraits de plantes a été pratiqué pendant de nombreux siècles, utilisant de nombreuses espèces végétales (**Aghwan, 1999; Al-aboody, 2001; AL-Eryani, 2002 ; AL-saimar et Zeki, 1999**).

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles et des extraits aqueux de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*, deux modèles d'inflammation aiguë ont été utilisés dans le teste *in vivo*. Induction de l'œdème de la patte postérieure du rat par un agent chimique qui est la carragénine et par un agent physique qui est le traumatisme causé par la chute d'un poids sur la patte. Ces modèles utilisent le Pléthysmomètre, qui permet de mesurer le volume d'inflammation (gonflement de la patte de rat) avec une exactitude suffisante, pour les deux types d'inflammation.

II.1. Appareils



Photo 8 : Digital Pléthysmomètre LE 7500

Le pléthysmomètre sert à mesurer l'efficacité des agents anti-inflammatoires. Il s'agit d'un appareil conçu pour la mesure précise et rapide de l'inflammation et de l'œdème chez les rongeurs de laboratoire comme les rats et les souris. Il est composé d'une cellule de mesure contenant de la solution saline dans laquelle on plonge la patte du rat, la petite différence de niveau de la solution après immersion de la patte est mesurée par un transducteur de conception et est affichée sur un appareil numérique (photo 8). Ce changement de volume est calibré en millilitre (ml) durant la phase d'étalonnage. La solution de remplissage de Pléthysmomètre contient NaCl 9 % et quelques gouttes de Triton X-100 (Fluka Biochemica).

La solution de carragénine préparé pour induire l'œdème contient 25 mg de carragénine dissous dans 10 ml de NaCl 9 %.

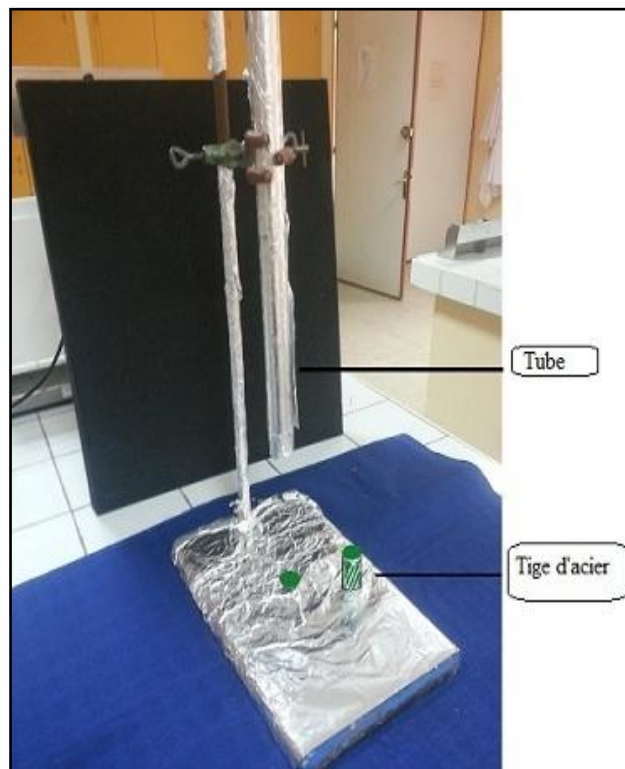


Photo 9 : Montage de traumatisme

Le montage de traumatisme (Photo. 9) est constitué d'un tube en plexiglas de 12 mm de diamètre intérieur et de 50 cm de longueur, et une tige d'acier de 10 mm de diamètre pesant environ 50g. On laisse tomber le poids à travers le tube au dessus de la patte pour induire l'œdème par un agent physique, la patte postérieure gauche est déposée sous le tube vertical en plexiglas (**Riesterer et Jacques., 1970**).

II.2. Test de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits des deux plantes est évaluée par une méthode chimique à la carragénine (Winter test) et une méthode physique par traumatisme expérimental (Riesterer and Jaques test).

2.1. Induction de l'œdème par la carragénine

L'inflammation induite par l'injection d'une solution de carragénine à 1 % chez le rat a été évaluée selon la méthode de (**Winter et al., 1972**). Les rats utilisés pour cette étude sont de souche Wistar, ils proviennent de l'élevage de l'Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Les expériences ont été réalisées chez des rats adultes, de poids compris entre 180 g et 220 g et ils ont été répartis au hasard en 8 lots homogènes de 6. Les rats ont jeuné pendant la nuit (18 heures) avant l'expérimentation. On mesure pour chaque rat le volume initial (V_0) de la patte postérieure. Ensuite, les rats ont reçu l'eau distillée ou l'huile d'arachide (témoin), l'extrait aqueux de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* (300 et 600

mg/kg ; VO) ou l'huile essentielle de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* (200, 400 mg/kg ; VO). Les rats constituant le groupe de référence ont reçu l'Indométacine à la dose de 10 mg/kg. Une heure après le traitement, 0,05 ml de solution à 1% de carragénine a été injecté à chaque rat sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. La patte postérieure droite n'est pas traitée, elle est considérée comme un témoin. L'évolution de l'œdème de la patte postérieure gauche par rapport à la patte postérieure droite a été déterminée à 1h30, 3h et 6h après l'injection de la carragénine (**Alaoui K et al., 1998**).

Nous avons calculé pour chaque lot, la moyenne de l'augmentation de l'œdème selon la formule : poids patte gauche (PPG) - poids patte droite (PPD).

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation pour chaque lot traité par les différentes doses des extraits et le médicament de référence, a été calculé en comparant la moyenne de l'augmentation de l'inflammation avec celle du lot témoin traité par l'eau distillée ou l'huile d'arachide.

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est calculé selon la formule suivante reportée par **Saézn et al., (1998)**:

$$\% \text{ d'Inhibition} = \frac{M (\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot témoin} - M (\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot traité}}{M (\text{PPG} - \text{PPD}) \text{ lot témoin}} \times 100$$

2.2. Induction de l'œdème par traumatisme

L'activité anti-inflammatoire est évaluée selon la méthode décrite par le test de **Riesterer et Jaques 1970**. Des rats mâles Wistar (180-220 g) ont été divisés en différents lots (n = 6). Les animaux ont jeûné pendant la nuit (18h). Tous les groupes ont reçu 5ml d'eau VO, le lot standard reçoit le médicament de référence indométacine 20 mg/kg ; VO. Les lots de l'essai reçoivent différentes concentrations de l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*. Au niveau de la patte postérieure gauche du rat (PG), une heure après l'administration orale des différentes substances, on crée un œdème expérimental en faisant tomber un poids de 50 g.

La patte postérieure gauche est déposée sous un tube vertical en plexiglas puis on laisse tomber le poids à travers le tube au dessus de la patte (**Riesterer et Jacques., 1970**). La patte postérieure droite est considérée comme témoin. La différence de volume entre la patte gauche et la patte droite est mesurée en utilisant un pléthysmomètre Digital 7500 à 1h30, 3h et 6h après l'induction de l'inflammation (**Alaoui et al., 1998**). Les pourcentages d'inhibition de l'inflammation ont été calculés selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'Inhibition} = \frac{M (v \text{ gauche} - v \text{ Droit}) \text{ lot témoin} - M (v \text{ gauche} - v \text{ Droit}) \text{ lot traité}}{M (v \text{ gauche} - v \text{ Droit}) \text{ lot témoin}} \times 100$$

III. Activité analgésique

La douleur est l'un des problèmes de santé les plus importants en raison de sa prévalence et du handicap qu'elle peut induire. Les douleurs chroniques peuvent être la conséquence de maladies inflammatoires ou de dommages aux tissus tels que les lésions nerveuses dans le cas de la douleur neuropathique. En Europe, la douleur chronique touche environ 17 à 45% de la population (Elliott et al., 2002) et le même ordre, voire plus, peut exister dans les pays en développement où la population, à faible pouvoir d'achat, ne peut accéder aux médicaments allopathiques. Les plantes médicinales sont largement utilisées dans le monde entier par les populations et sont source de nouveaux composants actifs, traitant spécialement de la douleur et des processus inflammatoires (Calixto et al., 2004; Télesphore et al., 2010). De plus, la douleur chronique est souvent résistante à la thérapie existante, un grand besoin de recherche de nouveaux médicaments se fait ressentir (Wang, L.X. et Wang, Z.J., 2003).

Ce travail propose d'étudier l'activité analgésique périphérique et centrale de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle des deux plantes *M. officinalis* et *M. rotundifolia* chez deux espèces de rongeurs (souris et rats). L'expérimentation est réalisée sur des souris Swiss et des Rats Wistar provenant de l'élevage de l'Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie-Rabat. Les souris sont des deux sexes, âgées de 2 à 2,5 mois et pèsent entre 20 et 30 g. Les rats sont âgés de 3 à 4 mois et pèsent 200 à 300g. Les animaux sont sains et les femelles non gravides ; les souris et les rats sont à jeun de nourriture 18 heures avant l'administration du produit.

Le test de l'activité analgésique consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits sur la douleur provoquée chez le rat par la chaleur (test de Tail Flick) ou par l'injection intrapéritonéale (IP) d'une solution diluée d'acide acétique (test de Koster).

III.1. Test de Koster

Nous avons réalisé ce test chez la souris pour étudier l'effet des extraits de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* sur la sensibilité nociceptive périphérique. L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique 3% provoque chez la souris une réaction typique de crampes, réaction caractérisée par de vagues de contractions et d'élongations de la musculature abdominale suivies par l'extension des pattes postérieures (Photo.10).

Les souris sont traitées avec l'extrait aqueux (300 et 600 mg/kg ; VO), l'huile essentielle de (200 et 400 mg/kg ; VO) de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* et l'acide acétyle salicylique utilisée comme référence (200 mg/kg ; VO) à raison de six souris par lots.

30 minutes après le traitement, chaque souris est ensuite injecté par de l'acide acétique (3 %, 0.1 ml) au niveau du péritoine, puis placé dans une enceinte en Plexiglas transparente. Le nombre de crampes est noté 5 minutes après l'injection de l'acide acétique et pendant une période de 20 minutes (**de Miranda et al., 2001**).



Photo 10 : Réaction typique de crampes

Le nombre total de crampes ou de torsions abdominales franches, permettant de calculer, le pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque lot traité par les différentes doses des extraits et d'acide acétyle salicylique, en comparant la moyenne du lot traité avec celle du lot témoin. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante (**Marzouk et al., 2010**):

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{M nbre T lot témoin}) - (\text{M nbre T lot traité})}{(\text{M nbre T lot témoin})} \times 100$$

III.2. Test de Tail-Flick

Ce test est utilisé pour rechercher l'action analgésique centrale, de type morphine. L'extrait aqueux (300 et 600 mg/kg ; VO), l'huile essentielle (200 et 400 mg/kg ; VO) de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*, et la substance de référence la morphine à 5 mg/kg ; SC, sont administrés 30 minutes avant le test. Le temps de réflexe de retraitement de la queue est mesuré à 15, 30, 45, 60 et 120 mn après l'administration des extraits chez des lots de 6 rats. Le seuil d'inhibition de la douleur se situe à 6 secondes (**Alaoui et al., 1998**). Un temps supérieur à 6 secondes révèle une action analgésique centrale type morphine. Le dispositif expérimental utilisé pour produire la chaleur est le Tail-flick (Analgesy-Meter LE 7106) qui est un appareil constitué d'une ampoule émettant de la chaleur irradiante de 55 à 60 °C, d'un chronomètre qui est déclenché en même temps que la source de chaleur irradiante, et d'une cellule photoélectrique qui arrête automatiquement le chronomètre dès que l'animal retire sa queue

(Photo 11). Au début de chaque épreuve, le rat est immobilisée dans une cage en plexiglas, la queue de l'animal est positionnée à sa mi-longueur sur le trajet lumineux, et repose sur l'orifice photoélectrique situé sur ce même trajet. Le comptage de la latence de retrait de la queue et l'émission de la chaleur irradiante sont simultanément déclenchés. L'émission de la chaleur et le chronomètre sont automatiquement arrêtés dès que la queue subit une brusque déflexion pour se mettre hors du trajet lumineux calorifique.

Avant tout traitement, nous avons procédé à un tri des animaux. Seuls les rats présentant un temps de retrait de la queue inférieur ou égal à 6 secondes seront retenus pour l'expérience. C'est le temps de réaction normal.

Pour la détermination des seuils nociceptifs, trois essais sont successivement réalisés à 20 minutes d'intervalle, à l'intérieur de chaque essai, trois mesures sont effectuées à une minute d'intervalle. La première mesure (9 secondes maximum) sert de mesurer l'état d'habitude de l'animal. La distance lampe queue et l'intensité de l'irradiation sont ajustées en vue d'obtenir le retrait de la queue pour un temps compris entre 4 et 6 sec lors des tests de témoin effectués avant l'injection de la substance à étudier. Après l'administration du produit, le temps maximum d'irradiation est de 30 secondes.



Photo 11 : Dispositif d'Analgesy-Meter LE 7106

**Activités *in Vitro* des extraits aqueux et des
huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de
*Mentha rotundifolia***

I. Evaluation du pouvoir antioxydant

Beaucoup de tests sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces tests sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé trois tests à savoir : Le test DPPH, FRAP et ABTS. Des modifications ont été, cependant, apportées afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

I.1. Test au DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée in vitro par le 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dont le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui possède une bande d'absorbance à 517 nm.

Le test utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par (Huang et al, 2011) en y apportant quelques modifications. Il consiste donc à mélanger, dans un tube en verre, 0.5 ml de solution méthanolique de DPPH (0.2 mM DPPH, dissous dans le méthanol) avec 2.5 ml de la solution d'extraits. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température de laboratoire et à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance a été lue à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Vis (SHIMADZU-2450). La décroissance de l'absorbance est convertie en pourcentage d'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité Antiradicalaire (\%)} = (\text{A témoin} - \text{A échant} / \text{A témoin}) \times 100$$

A témoin : Absorbance du témoin

A échant : Absorbance des échantillons testés

I.2. Test de la réduction du fer « FRAP »

Le test de la réduction du fer est considéré comme un test direct et rapide est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques.

Le protocole est basé sur la méthode décrite par Oyaizu en 1986, qui a subi quelques modifications.

Différentes concentrations de chaque extrait et de l'acide ascorbique standard ont été mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphaté (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %. Les solutions ont été secouées immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% est additionné au mélange réactionnel. Le tout est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. 2,5 ml de surnageant de chaque concentration est

mélangé avec 2,5 ml d'eau désionisée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl_3 à 0,1%. L'absorbance est mesuré à 700 nm contre un blanc.

I.3. Test de la capacité antioxydante en équivalent Trolox ou «ABTS»

Le test ABTS a été réalisé en utilisant la méthode de **Re et al., 1999**. Le radical cationique ABTS^+ a été obtenu par la réaction entre 10 ml d'ABTS à 2 mM et 100 μl de persulfate de potassium à 70 mM. Le mélange est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 24 heures à température ambiante. La solution d' ABTS^+ est diluée avec du méthanol pour obtenir une absorbance de 0.7 à 734 nm. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicat. En diluant 100 μl d'extrait dans 2 ml de la solution d' ABTS^+ , une minute après, l'absorbance du radical ABTS^+ est mesurée à 734 nm.

L'activité antioxydante des échantillons est alors exprimée par la capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC), définie comme la concentration de l'étalon Trolox avec la même capacité antioxydante de l'extrait.

II. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Notre travail consiste à étudier l'activité antimicrobienne des extraits de *Melissa officinalis* L. et *Mentha rotundifolia* L. via la méthode de diffusion sur disque de papier pour déterminer le diamètre d'inhibition et de calculer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

II.1. Souches bactériennes

Pour tester l'activité antibactérienne des extraits de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*, six souches sensibles ont été utilisées ; dont quatre de type Gram-négatif ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Enterobacter cloacae*. Et deux de type Gram-positif ; *Streptococcus pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus*.

Ces souches proviennent du Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina de Rabat.

II.2. Préparation de pré-cultures

Les souches microbiennes sont ensemencées par stries dans un milieu de gélose nutritive, après incubation 18 h à 37° C, quelques colonies bien isolées sont prélevées à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, on décharge l'anse de platine dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % et on homogénéise la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex ensuite on fait des dilutions afin de standardiser la suspension bactérienne. L'inoculum est ajusté à 0.5 Mc Farland correspondant à une densité optique de (0.08 à 0.10) à 625 nm. La concentration finale de l'inoculum est de 10^7 UFC/ml. (Bendahou et al., 2007)

II.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La méthode des aromatoigrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des extraits des plantes, cette méthode est décrite par **Jacob et Tonei, 1979**. Elle consiste à utiliser des disques de papier stérile de 6 mm imprégnés des concentrations différentes des extraits. Une série de dilutions (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) de l'huile essentielle dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée et de l'extrait aqueux dans l'eau distillée.

L'agar Muller-Hinton (MH) stérile a été coulé dans des boîtes de pétri stériles de 9 cm. 1 ml de l'inoculum préparé à partir de chaque souche est uniformément bien étalé à la surface de l'agar MH. L'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration (**Bansod et rai, 2008**). Un volume correspondant à cinquante microlitres des dilutions des extraits de l'huile essentielle et aqueux est déposé sur des disques de papier filtre stérile (whatman n°1, 6 mm de diamètre).

A l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface de gélose inoculée et incubée à 37° C pendant 18 heures. Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al, 2006**). En parallèle, le DMSO et l'eau distillée sont utilisés (témoins négatifs) afin de vérifier la croissance des différentes souches (**Bekhechi et al., 2008**), et comme témoin positif la Ciprofoxacine a été utilisée. L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (DZI). Le résultat est exprimé par le DZI et peut être symbolisé par des croix. non sensible (-) pour $D < 8$ mm; sensible (+) pour D compris 9-14 mm; très sensible (++) pour D compris 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour $D > 20$ mm (**Ponce et al., 2003**).

TROISIÈME PARTIE
RÉSULTATS ET DISCUSSION



Extraction et criblage phytochimique

I. Rendement d'extraction

Le rendement des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* est déterminé par le rapport :

$$\% \text{ Rendement} = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de la matière végétale avant extraction}} \times 100$$

Tableau 1 : Rendement des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*

Espèce	Extraits	(%) Rendement
<i>Melissa officinalis</i>	Huile essentielle	0.4
	Extrait aqueux	16.5
<i>Mentha rotundifolia</i>	Huile essentielle	1.56
	Extrait aqueux	20.35

Les résultats montrent que le rendement de l'extrait aqueux des deux plantes étudiées est très important, alors que celui de l'huile essentielle est faible (Tab. 1).

II. Criblage phytochimique des extraits aqueux

La mise en évidence de différentes classes des métabolites secondaires constituant les plantes, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Nous avons réalisé des tests phytochimiques des extraits aqueux de *M. officinalis* et *M. rotundifolia*. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, et la coloration qui sont proportionnelles à la quantité de la substance recherchée.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représentée par : -

Les groupes chimiques sont présentés sur le tableau ci-dessous

Tableau 2 : Criblage phytochimique des différentes familles chimiques contenues dans l'extrait aqueux

Les groupes chimiques		Extrait aqueux	
		<i>Melissa officinalis</i>	<i>Mentha rotundifolia</i>
Stérols et polyterpènes		-	-
Polyphénols		++	+++
Flavonoïdes		++	+++
Tannins	Catéchiques	++	++
	Galliques	+	++
Alcaloïdes		-	-
Saponines		++	+
Anthocyanes		-	-
Dérivés anthracéniques	Libre	-	-
	Combinée	-	-

Les résultats du screening phytochimique des deux plantes *M. officinalis* et *M. rotundifolia* sont reportés dans le tableau 2.

C'est principalement les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les saponines qui sont détectés dans les deux plantes. Les terpènes, les alcaloïdes, les anthocyanes et les dérivés anthracéniques n'étaient pas mis en évidence par le screening phytochimique. En effet, la présence des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins est en quantité élevée dans l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* par rapport à l'extrait aqueux de *M. officinalis*.

L'étude complète du screening phytochimique met en évidence la présence des composés chimiques possèdent des activités biologiques intéressantes, notamment les substances polyphénoliques (Tanins et Flavonoïdes).

Les tanins surtout galliques exercent une activité antidiarrhéique, certaines sont connues pour leurs propriétés antiseptique, antibactérienne et antifongique. Les tanins possèdent une grande activité antioxydante, ce sont de très bons piègeurs des radicaux libres et inhibent la formation du radical superoxyde.

Les flavonoïdes possèdent des activités antioxydante, anti-inflammatoire et jouent un rôle positif dans le traitement des maladies cardiovasculaire et neurodégénérative. Dans certains cas ils sont connus pour leur activité antivirale, antimicrobienne et anti-tumorale. Les extraits de *M. officinalis* et *M. rotundifolia* par la présence de ses familles chimiques révèlent des activités pharmacologiques potentielles, ces drogues constituent donc un cible de choix pour enrichir la production des médicaments.

III. Dosage phytochimique des extraits

III.1. Dosage des polyphénols

L'analyse quantitative des phénols des extraits des deux plantes étudiées a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique établie séparément. La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par 1 gramme d'extrait (mg EAG / g). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (3).

Tableau 3 : Quantité des polyphénols dans les extraits

	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Mentha rotundifolia</i>
Extrait aqueux	23.53	37.005
Huile essentielle	2.12	3.17

A partir des résultats de tableau 3, on aperçoit que les extraits aqueux sont les plus riches en phénols que l'huile essentielle et que la teneur en phénols dans *M. rotundifolia* est toujours plus grande que celle dans *M. officinalis* pour tous les extraits.

La figure 5, présente une comparaison de la teneur en polyphénols entre les deux espèces dans les différents extraits étudiés.

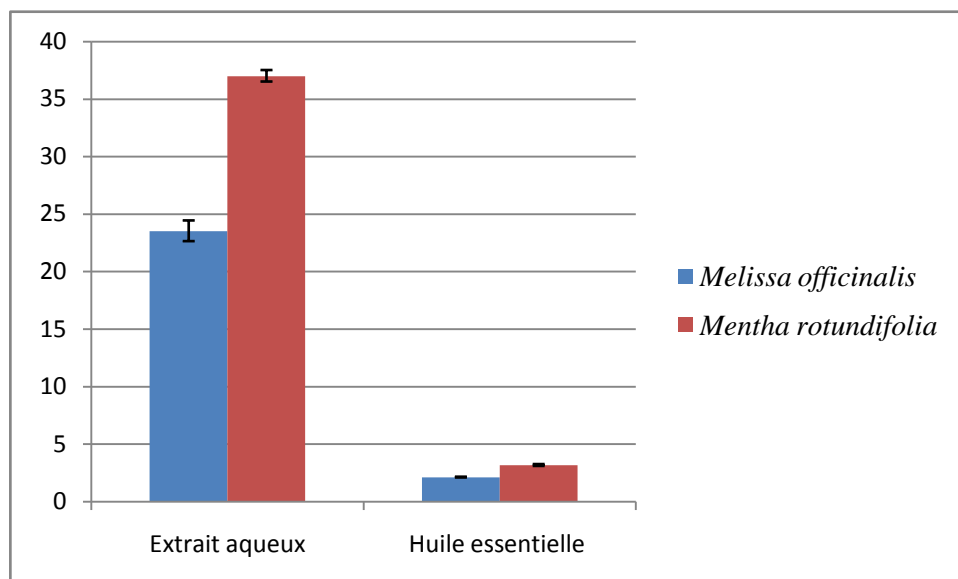


Figure 5 : Comparaison de la teneur en polyphénols entre les deux espèces.

III.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant la Rutine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de Rutine par 1 gramme de l'extrait (mg ER / g de l'extrait). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Quantité des flavonoïdes dans les extraits

	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Mentha rotundifolia</i>
Extrait aqueux	16,4	30,66
Huile essentielle	1,76	2,2

Selon les résultats du tableau, la teneur en flavonoïdes dans l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* est la plus grande. Mais en général la quantité des flavonoïdes dans les extraits aqueux pour les deux plantes est supérieure aux huiles essentielles.

La figure 6 présente une comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les deux espèces dans les différents extraits étudiés.

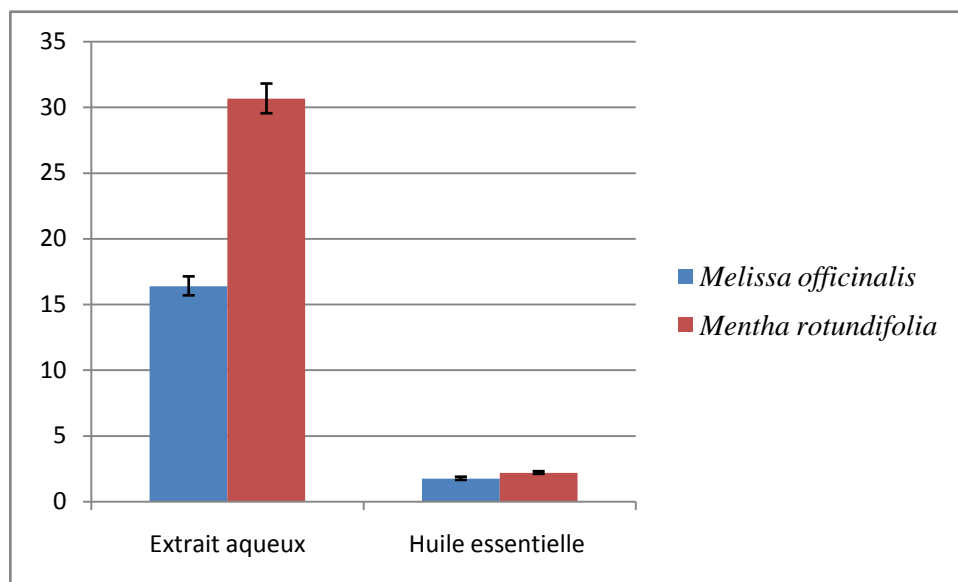


Figure 6 : Comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les deux espèces.

IV. Analyse des huiles essentielles

L'identification des différents constituants des huiles essentielles étudiées est réalisée par CPG/SM en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée NIST 2005 et WILEY (275L), et confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature (**Kondjoyan et al., 1996; Adams, 2001**).

Les résultats de l'identification des constituants des deux huiles essentielles, sont présentés dans les tableaux 5 et 6. Ces derniers regroupent les données expérimentales suivantes :

- Le nom de la molécule identifiée,
- Le temps de rétention,
- Les concentrations relatives des différentes molécules exprimées en %.

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a permis d'identifier plusieurs composés qui représentent environ 97,25 % pour *Melissa officinalis*, (**Figure 7, Tableau 5**) et 91,65 % pour *Mentha rotundifolia* (**Figure 8, Tableau 6**).

RT: 4.01 - 45.02 SM: 15G

NL:
2.89E6
TIC F: MS
312UATRS
11_GC01

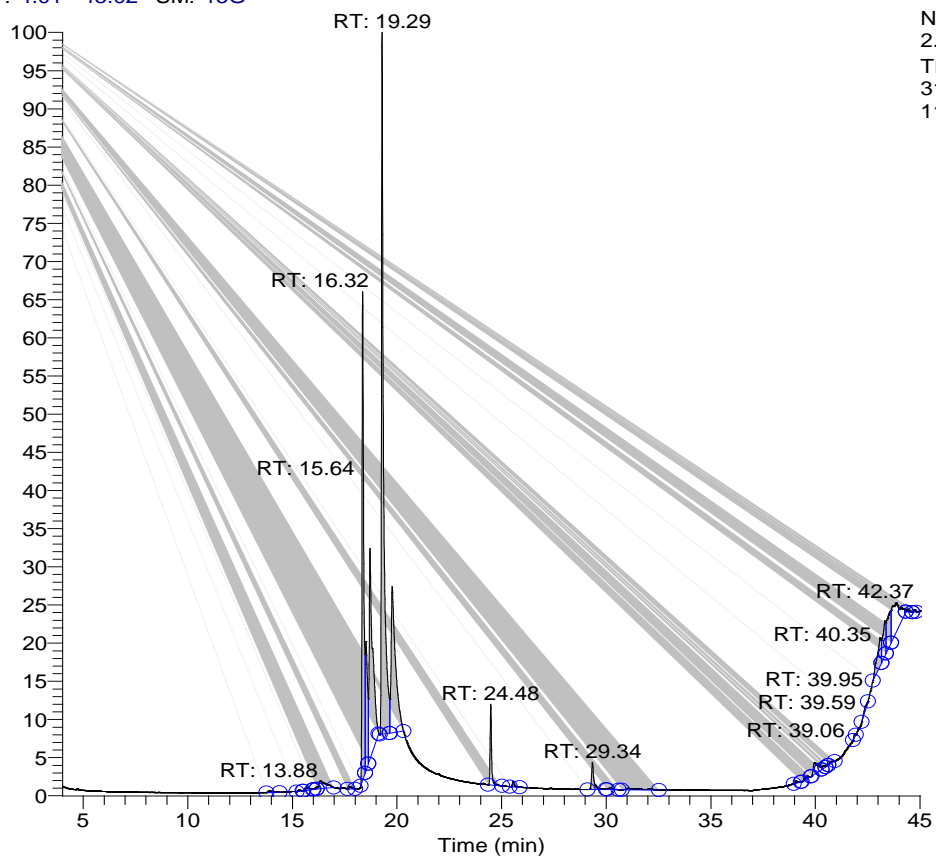


Figure 7 : Analyse CPG/SM de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*

Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*

Temps de rétention	Pourcentage	Composés
19.29	30,44	Nérol
18.71	27,13	Citral
16.32	23,08	Isopulégol
42.37	12,46	Dodecaméthyl hexasiloxane
24.48	02,29	Caryophyllène
29.34	01,24	Oxyde de Caryophyllène
15.64	00,24	Photocitral a
25.54	00,19	α -Humulène
13.88	00,18	Squalène

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* du Maroc est composée principalement de Nérol (30,44 %), de Citral (27,13 %), de l'Isopulégol (23,08 %), et de Dodecaméthylhexasiloxane (12,46 %) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles: Caryophyllène (2,29 %), Oxyde de Caryophyllène (1,24 %), Photocitral a (0,24 %), α -Humulène (0,19 %) et Squalène (0,18 %), totalisant 97,25 %.

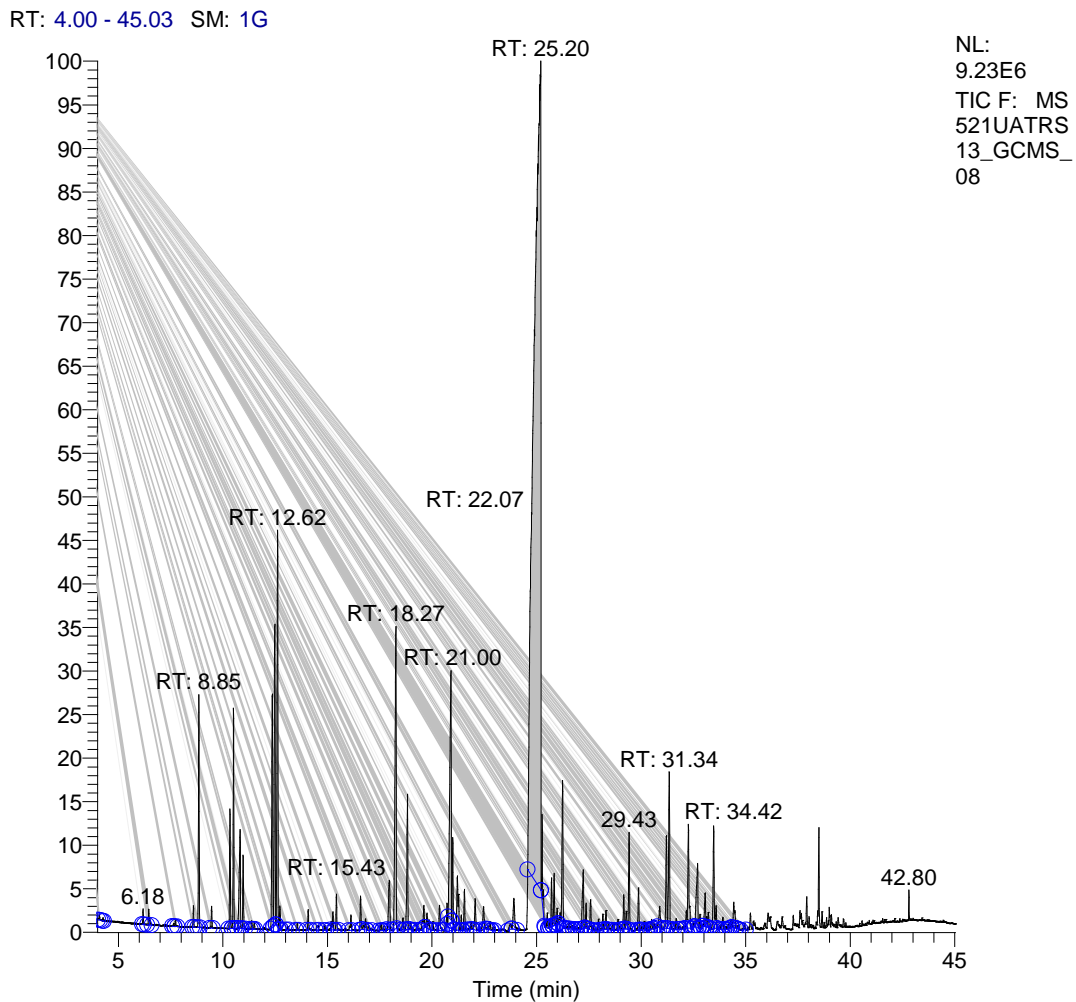


Figure 8 : Analyse CPG/SM de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* a entraîné l'identification de 29 composés, représentant 91,65 % de la composition totale. Les résultats de cette identification sont regroupés dans le tableau 6. L'oxyde de pipériténone est le composé majoritaire de cette HE avec un pourcentage de 54,60 %.

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

TR	%	Composés	TR	%	Composés
25.20	54.60	Oxyde de Pipériténone	31.21	0.92	Spathulénol
18.27	3.49	Trans-Sabinène hydrate	29.43	0.90	Cis-calaménène
20.91	3.44	Ascaridole	21.21	0.78	Arthole
12.62	3.44	Terpinène 1-ol	34.42	0.74	Cis-Jasmone
12.49	2.83	δ Limonène	17.96	0.67	α-Santoline alcohol
10.51	2.53	α-Phellandrène	21.00	0.64	2-Octenal, 2-butyl-
12.37	2.09	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	10.96	0.54	Sabinène
31.34	1.92	Oxyde de caryophyllène	33.06	0.42	Cadinène
32.26	1.84	Germacrène D	22.07	0.3	Dihydroedulan I
33.47	1.58	α-Muuroène	19.61	0.29	Anisole, O-Isopropenyl-
8.85	1.57	α-Pinène	16.58	0.28	Triplal 1
26.24	1.56	Trans-caryophyllène	15.43	0.26	1 Octen 3 Yl Acetate
18.83	1.28	Cis-Sabinène	20.36	0.25	Pulégone
27.23	1.13	Oxyde de pipériténone	19.76	0.24	Nérol
10.83	1.12	Trans-2-Ethyl-2-hexen-1-ol			

Les huiles essentielles de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* de couleur jaunâtre, ont été obtenues par hydrodistillation avec un rendement d'extraction de 0,4 % et de 1,56 % respectivement. La couleur est fortement influencée par la nature du mélange complexe des constituants de l'huile. Les résultats regroupés dans les tableaux (5 et 6), montrent que 7 composés pour l'huile essentielle de *M. officinalis* ont pu être identifiés, ce qui représente 97,25 % de notre huile essentielle. Et 29 composés pour l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est marqués par la présence de l'Oxyde de pipériténone 54,60 %.

Étude Toxicologique

I. Toxicité aiguë de *Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*

Détermination de la DL₅₀ d'après la ligne directrice OCDE 423

Pour l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. officinalis* et *M. rotundifolia*, la DL₅₀ est déterminée par la méthode décrite dans la ligne directrice Européenne de l'OCDE code 423.

A 300 mg/kg des extraits aqueux et des huiles essentielles, les souris restent normales après injection par voie orale, à part une légère sédation qui se manifeste chez les souris traitées par l'huile essentielle de *Melissa officinalis*.

A la dose de 2000 mg/kg, nous avons enregistré un seul cas de décès pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis*. Juste après injection par voie orale, la souris présente des signes de malaise : accélération de la respiration, agitation, tremblement et le décès survient le deuxième jour. Les survivants ne s'alimentent pas mais elles retrouvent leur état normal à partir du deuxième jour. Le poids des souris pour tous les extraits n'a pas subi de modification significative pendant les quatorze jours qui ont suivi le traitement. Nous avons observé un effet sédatif chez les souris traitées par les huiles essentielles des deux plantes.

La DL₅₀ (Dose Létale 50%) déterminée selon la méthode de toxicité aiguë OCDE code 423 par voie orale est supérieur à 5000 mg/kg pour les extraits aqueux et pour l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*. Par contre la DL₅₀ de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* est estimée à 2500 mg/kg (tableau 7)

Tableau 7 : Les résultats des essais de la toxicité aiguë des extraits de *M. officinalis* et *M. rotundifolia*

Plantes	Extraits	DL ₅₀	catégorie
<i>Melissa officinalis</i>	Extrait aqueux	> 5 g/kg	V
	Huile essentielle	2500 mg/kg	V
<i>Mentha rotundifolia</i>	Extrait aqueux	> 5 g/kg	V
	Huile essentielle	> 5 g/kg	V

II. Toxicité chronique

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* et l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* sont très faiblement toxiques. C'est pour cela, nous avons évalué la toxicité chronique de ces deux extraits en utilisant des doses expérimentalement thérapeutiques, afin d'apprécier l'impact de ces extraits après administration répétée.

Les résultats de la toxicité chronique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* sont répartis en cinq points :

- Comportement des animaux ;
- Evolution du poids corporel des animaux ;
- Analyse des données hématologiques du sang ;
- Analyse des constantes biochimiques du sang ;
- Examen anatomopathologique des organes des animaux sacrifiés.

II.1. Toxicité chronique de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*

- **Comportement des animaux**

Durant toute la période du traitement, aucune mortalité n'a été enregistrée ni dans le lot des témoins ni dans les lots des rats traités.

Les rats traités à la dose de 100 mg/kg se comportaient normalement et les rats traités à la dose de 200 mg/kg manifestent une légère sédation, pendant environ 10 minutes, juste après l'administration de l'huile essentielle puis reprennent leur état normal.

- **Evolution pondérale**

Les résultats de l'évolution pondérale des animaux de deux groupes traités sont présentés dans le tableau ci-dessous.

En comparaison avec le poids corporel du premier jour de l'expérience, un gain significatif et normal du poids a été noté, au bout de 90 jours, chez les rats témoins ainsi que chez ceux traités par les doses respectives de 100 et 200 mg/kg. Toute fois, une différence est observée entre les deux lots, le poids des animaux traités à la dose de 100 et 200mg/kg reste supérieur à celui des animaux non traités.

Ces changements du poids observés ne sont pas statistiquement significatifs.

Tableau 8 : Poids corporel des rats traités par l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L.

Semaines	Témoïn	<i>Melissa officinalis</i>	
		100 mg/kg	200 mg/kg
S 0	192.17 ± 13.62	192.45 ± 10.81	191.62 ± 13.53
S 1	208.19 ± 12.72	222.59 ± 19.58	222.26 ± 17.00
S 2	225.61 ± 11.70	231.70 ± 24.66	232.24 ± 19.95
S 3	234.45 ± 11.59	241.96 ± 31.59	244.90 ± 26.65
S 4	239.27 ± 13.62	250.96 ± 30.05	256.81 ± 17.41
S 5	243.28 ± 15.12	260.98 ± 30.96	262.99 ± 24.36
S 6	252.19 ± 17.96	270.88 ± 28.41	270.97 ± 26.81
S 7	256.58 ± 18.52	280.26 ± 27.50	280.13 ± 26.31
S 8	263.07 ± 19.21	288.88 ± 38.38	290.67 ± 24.38
S 9	269.68 ± 21.88	294.6 ± 37.72	296.12 ± 21.37
S 10	276.84 ± 27.46	300.24 ± 31.52	301.74 ± 21.64
S 11	280.39 ± 24.94	304.98 ± 29.30	306.61 ± 22.43
S 12	286.32 ± 25.15	309.04 ± 41.23	310.37 ± 27.41

Effet de *M. officinalis* sur les paramètres hématologiques et biochimiques

Les différents paramètres biologiques ; hématologiques et biochimiques ont été déterminés pour évaluer l'impact de notre produit sur les différents métabolismes et organes cibles.

• Paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques analysés sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9: Effet de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres hématologiques chez les rats Wistar.

Paramètres	témoin	Huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L.					
		Temps de traitement					
		30 jours		60 jours		90 jours	
		100 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
GR ($10^6/\mu\text{l}$)	7.89 ± 0.73	7.53 ± 1.05	7.69 ± 0.81	7.66 ± 0.53	8.14 ± 0.72	8.08 ± 0.5	8.5 ± 0.93
HGB (g/dl)	14.58±0.73	13.88 ± 1.5	14.26±1.01	13.71±1.34	14.25±0.94	14.8±0.74	15.08 ±0.46
HCT (%)	39.53 ± 0.6	41.08±4.03	42.26±3.56	41.31±4.49	41.91±2.11	42.65±3.53	42.76 ± 3.4
PLQ ($10^3/\mu\text{l}$)	623 ± 63	583 ± 61	574 ± 97	620 ± 53	586 ± 83	578 ± 90	586 ± 82
GB ($10^3/\mu\text{l}$)	10.54 ± 2.1	10.53±2.34	11.04±1.97	11.07 ± 2	12.35±3.04	10.94±1.67	11.74±2.34
NEUT (%)	20.08±2.05	21.08±1.82	20.51±1.99	21.03±2.1	20.85±3.08	21.91±0.09	21.9 ± 0.3
LYMPH (%)	70.51±2.66	69.98±4.06	69.86±3.01	69.81±2.77	68.03±4.07	65.43±3.76	64.53±7.08
MONO (%)	2.03 ± 1.23	1.66 ± 1.05	1.66 ± 0.98	1.78 ± 1.33	2.75 ± 1.74	1.81 ± 1.46	2.36 ± 1.23
EO (%)	1.7 ± 0.23	1.48 ± 0.46	1.5 ± 0.62	1.83 ± 0.63	1.66 ± 0.35	2.1 ± 1.46	2.18 ± 0.5
MCV (fl)	53.22 ± 3.1	54.72±3.22	53.75±1.83	53.15±5.26	50.23±3.24	53.17±3.75	52.1 ± 4.51
MCH (pg)	18.33±0.59	17.76±0.53	18.11±0.95	17.78±0.86	17.73±0.72	18.35±0.48	18.21±1.02
MCHC (g/dl)	36.13±1.17	36.34 1.13	36.65±1.34	35.1 ± 0.37	35.33±0.92	35.95±2.43	35.12±1.53

Au regard de ces résultats, aucune différence significative n'est observée chez les rats traités par rapport aux lots témoins, même si le nombre des jours de traitements augmente. L'évolution des paramètres hématologiques restent identiques dans les deux lots d'animaux traités, par rapport aux résultats du lot témoin.

- **Paramètres biochimiques**

Les résultats des différents paramètres biochimiques dosés sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau 10 : Effet de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar

		Huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L.					
		Temps de traitement					
		30 jours		60 jours		90 jours	
Paramètres	Témoin	100 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
ASAT (U/I)	231.66 ± 68.5	221 ± 74.8	236 ± 21	195 ± 13	180 ± 27	201 ± 52	192 ± 25
ALAT (U/I)	67.33 ± 7.52	67.66 ± 5.68	66.83 ± 7.25	67.16 ± 0.75	66.16 ± 6.67	67.33 ± 4.96	67.33 ± 7.33
Triglycérides (g/l)	0.66 ± 0.17	0.66 ± 0.25	0.65 ± 0.2	0.67 ± 0.005	0.67 ± 0.36	0.66 ± 0.15	0.67 ± 0.09
Cholestérol (g/l)	0.86 ± 0.02	0.86 ± 0.15	0.86 ± 0.16	0.79 ± 0.06	0.8 ± 0.06	0.8 ± 0.2	0.82 ± 0.3
Protéine T (g/dl)	66.83 ± 4.26	67.16 ± 3.65	67.16 ± 3.06	66.33 ± 6.62	67 ± 3.34	68.5 ± 1.51	69.83 ± 1.83
Urée (mg/l)	0.26 ± 0.05	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.33 ± 0.04*	0.39 ± 0.03*	0.38 ± 0.03*
Créatinine (mg/l)	5 ± 0.63	4.5 ± 0.54	4.5 ± 0.79	6.16 ± 0.75	6.16 ± 0.75	5.83 ± 0.14	5.5 ± 0.54
Glucose (g/l)	1.52 ± 0.12	1.13 ± 0.14*	1.16 ± 0.2*	1.21 ± 0.2*	1.20 ± 0.2*	1.13 ± 0.13*	1.13 ± 0.2*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Au vu de ces résultats, nous constatons que l'ALAT, l'ASAT, les Triglycérides, le Cholestérol, les Protéines totales et la Créatinine n'ont pas connu une modification significative dans les deux lots traités. Par contre, la Glycémie et l'Urée ont connue une différence significative dans les deux lots d'animaux (tableau 10).

La différence de taux de la glycémie est observée à partir de 30 jours de traitement, une diminution significative de taux de la glycémie chez les deux lots traités reste jusqu'au bout de traitement.

Aux 60 jours de traitement, nous avons noté qu'en plus de la diminution de la glycémie, une augmentation significative du taux de l'urée à la dose de 200 mg/kg. Ainsi que, au bout de traitement (90 jours) les deux groupes d'animaux traités (100 et 200 mg/kg ; VO) ont connu une augmentation significative du taux de l'urée (tableau 10).

- **Examen anatomopathologique**

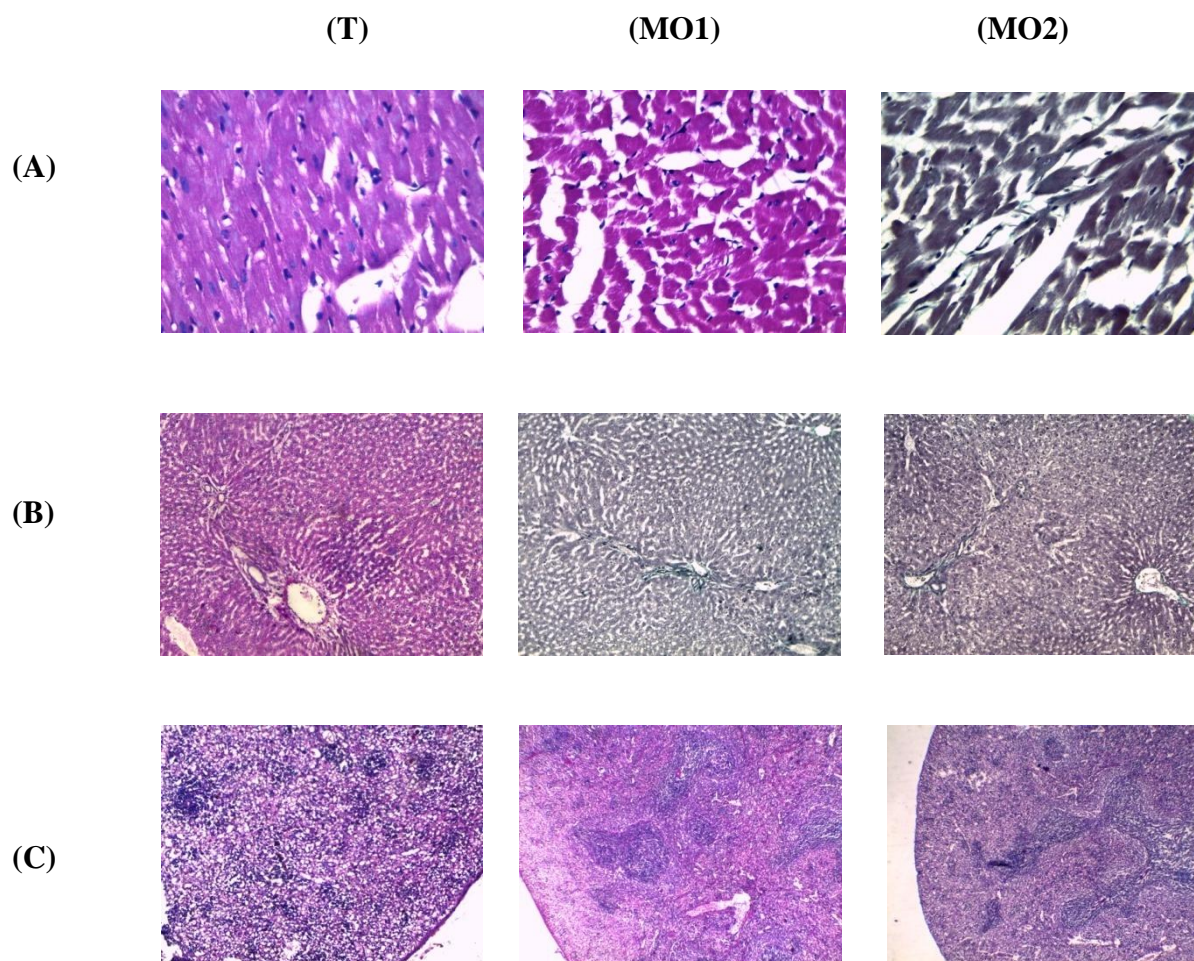
L'observation macroscopique des organes (les poumons, le cœur, le foie, les reins et la rate) n'a révélé aucune anomalie morphologique et/ou présence d'hémorragie qui pourrait être dûes à l'administration de l'huile essentielle de la mélisse.

L'analyse statistique du poids des organes des lots traités aux doses 100 et 200 mg/kg n'a montré aucune différence significative par rapport au lot témoin (Tableau 11).

L'examen histologique des tissus des poumons, du cœur, de foie, et de la rate n'a montré aucune pathologie caractéristique, ni anomalie dans l'architecture des cellules par rapport aux témoins. Par contre au niveau des reins, nous avons mis en évidence la présence d'une ischémie glomérulaire et nous avons aussi noté la présence d'une nécrose tubulaire focale (Figure 9 (E)).

Tableau 11 : Effet de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* sur le poids des organes prélevés chez les rats après 90 jours de traitement par voie orale.

Organes	Témoin	Huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> L.	
		100 mg/kg	200 mg/kg
poumons	1.81 ± 0.05	1.81 ± 0.07	1.81 ± 0.06
Cœur	0.88 ± 0.09	0.88 ± 0.08	0.87 ± 0.08
foie	10.43 ± 0.24	10.44 ± 0.07	10.76 ± 0.12
Reins	0.85 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.85 ± 0.02
Rate	0.72 ± 0.02	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.04



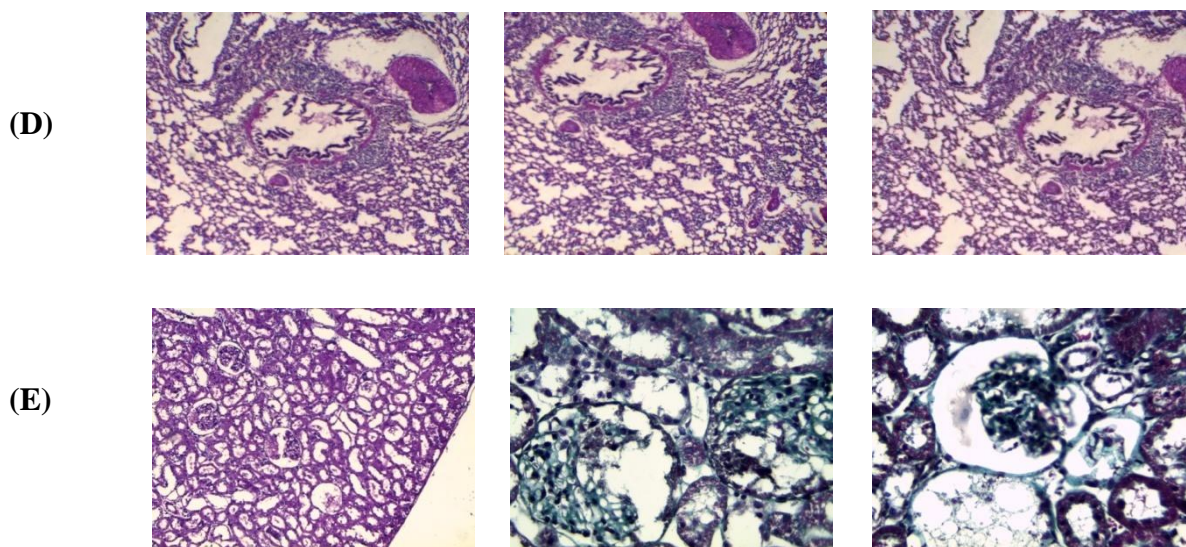


Figure 9 : Microphotographie de cœur (A), foie (B), rate (C), poumons (D), reins (E) des rats traités par l'HEMO aux doses 100 et 200 mg/kg (MO1 et MO2) et des rats témoins (T).

II.2. Toxicité subchronique de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*

- **Comportement des animaux**

Durant les 90 jours d'observation des rats, aucun décès n'a été enregistré. Le comportement des animaux reste normal et comparable à celui des rats témoins.

Aucune modification n'a été enregistrée aussi bien au niveau du comportement qu'au niveau de l'apparence externe des animaux

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait étudié n'a pas d'effet toxique chez le rat. Leur administration quotidienne (300 et 600 mg/kg ; VO) n'a pas provoqué de mortalité.

- **Evolution pondérale**

Le poids des rats (Tableau 12) n'a pas subi de modification significative pendant les 90 jours de traitement par l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* (300 et 600 mg/kg ; VO). Cependant, l'évolution du poids corporel des rats traitées ne montre aucune différence remarquable par rapport aux rats témoins; ce qui nous permet de déduire, l'absence de signes de toxicité chez les rats traités par l'extrait aqueux de la plante étudiée et la tolérance de cet extrait chez le rat.

Tableau 12 : Poids corporel des rats traités par l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* L.

Semaines	Témoïn	<i>Mentha rotundifolia</i>	
		300 mg/kg	600 mg/kg
S 0	187.86 ± 9.14	188.94 ± 10.2	187.09 ± 11.37
S 1	204.24 ± 10.98	212.29 ± 9.78	205.64 ± 9.97
S 2	221.69 ± 10.28	218.69 ± 10.81	217.36 ± 10.16
S 3	230.98 ± 10.78	225.88 ± 9.15	224.73 ± 6.57
S 4	235.85 ± 11.23	230.01 ± 11.35	229.46 ± 8.35
S 5	240.16 ± 7.62	235.97 ± 10.01	235.42 ± 7.05
S 6	249.82 ± 10.4	243.67 ± 13.25	241.93 ± 11.38
S 7	255.23 ± 11.94	248.79 ± 10.11	246.09 ± 8.57
S 8	262.49 ± 9.78	254.02 ± 10.24	250.72 ± 6.96
S 9	260.58 ± 8.74	262.37 ± 8.78	258.54 ± 6.5
S 10	277.37 ± 11.16	278.83 ± 10.9	268.37 ± 7.73
S 11	277.27 ± 7.08	276.04 ± 11.48	273.10 ± 10.99
S 12	286.85 ± 10.08	286.84 ± 9.53	284.47 ± 9.28

- **Paramètres hématologiques**

Les résultats de l'analyse hématologique des rats traités aux doses 300 et 600 mg/kg par voie orale de *Mentha rotundifolia* sont illustrés dans le tableau 13. On n'observe aucune modification significative.

Tableau 13 : Effet de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* L. par l'administration orale et répétée (90 jours) sur les paramètres hématologiques chez les rats Wistar.

Paramètres	Extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>						
	Témoin	Temps de traitement					
		30 jours		60 jours		90 jours	
		300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg
GR (10 ⁶ /µl)	7.89 ± 0.73	7.46 ± 0.05	7.92 ± 0.21	8.31 ± 0.53	7.81 ± 0.72	8.4 ± 0.5	7.8 ± 0.8
HGB (g/dl)	14.5 ± 0.73	13.5 ± 0.95	14.1 ± 1.01	16 ± 1.34	15.6 ± 0.94	15.5 ± 0.74	16.3 ± 0.46
HCT (%)	39.53 ± 0.6	36 ± 4	38 ± 3	41.31 ± 4	40 ± 2	42 ± 3	40.7 ± 2
PLQ (10 ³ /µl)	623 ± 63	683 ± 50	674 ± 47	650 ± 53	598 ± 63	578 ± 70	586 ± 62
GB (10 ³ /µl)	8.54 ± 1.1	8.66 ± 1.34	7.96 ± 1.97	9.37 ± 2	8.45 ± 1.64	7.8 ± 1.97	8 ± 1.34
NEUT (%)	16 ± 2	12 ± 2.3	13 ± 1.5	15.3 ± 2.6	17 ± 0	18 ± 1	21.3 ± 2.6
LYMPH (%)	80.51 ± 2.6	85.1 ± 3.1	84.23 ± 3.2	82.81 ± 2.9	80.03 ± 3.07	80.1 ± 4.02	79.3 ± 4.32
MONO (%)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0
EO (%)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1.8 ± 0.44	2 ± 0	2 ± 0
VGM (fl)	53.22 ± 3.1	56.3 ± 3.22	55.5 ± 1.83	50.4 ± 5.26	53.09 ± 3.24	50.1 ± 3.75	52.4 ± 4.51
TCMH (pg)	19 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	19 ± 0	20 ± 0	18.6 ± 0.89	21 ± 0
CCMH (g/dl)	36.1 ± 1.17	37.3 ± 0.51	36.6 ± 0.51	39 ± 0.63	38.16 ± 0.4	37.5 ± 0.83	40.3 ± 0.51

- **Paramètres biochimique**

L'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* n'a induit aucun changement significatif de la concentration de l'ALAT, de l'ASAT, de Créatinine et de l'Urée dans le sang. Cependant, l'extrait étudié aux doses 300 et 600 mg/kg a provoqué une diminution significative de glucose après 30 et 60 jours (tableau 14). Mais, au bout du traitement (90 jours) le taux de glycémie devient normal.

Tableau 14 : Effet de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia L.* par l'administration orale et réitérée (90 jours) sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar.

		Extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia L.</i>					
		Temps de traitement					
		30 jours		60 jours		90 jours	
Paramètres	Témoin	300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600mg/kg
ASAT (U/I)	86.2 ± 4.02	86.6 ± 7.75	86.8 ± 4.08	88 ± 5.83	87 ± 4.63	89 ± 5.56	89.2 ± 5.8
ALAT (U/I)	64.6 ± 3.43	63.4 ± 3.64	63.6 ± 2.6	63.6 ± 1.34	65.2 ± 2.68	65.8 ± 4.6	67 ± 2.34
Urée (mg/l)	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.29 ± 0.04	0.28±0.03
Créatinine (mg/l)	4.68 ± 0.19	4.9 ± 0.23	4.94 ± 0.18	4.92 ± 0.27	4.96 ± 0.28	4.94 ± 0.23	4.96±0.26
Glucose (g/l)	1.58 ± 0.14	1.01±0.06*	1.15±0.23*	1.09±0.24*	1.04±0.22*	1.37±0.29	1.49±0.28

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

- **Examen anatomopathologique**

Pour les doses testées (300 et 600 mg/kg ; VO), les résultats du poids des organes cibles (le cœur, le foie, la rate, les poumons et les reins) ne montrent aucune différence significative entre les rats témoins et les rats traités (Tableau 15).

L'étude anatomopathologique, se répartit en deux examens :

- le premier macroscopique
- Le second examen, est l'examen microscopique.

L'observation macroscopique des organes étudiés n'a révélé aucune inflammation ni œdème ou ganglions ni hypertrophie. Mais l'observation des poumons a permis de mettre en évidence la présence d'un foyer blanchâtre bilatéral.

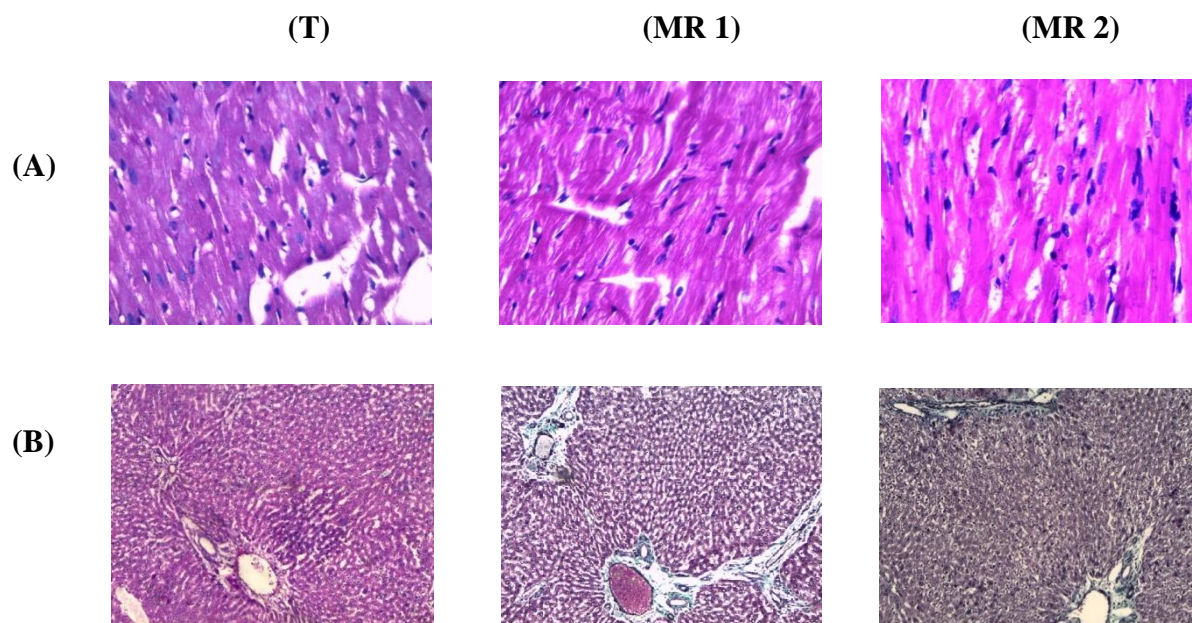
L'examen microscopique des tissus des reins, du cœur et du foie a montré une architecture normale semblable à celle du groupe témoin, suggérant qu'aucun changement dommageable ou des perturbations morphologiques n'aient été causés par l'administration orale réitérée de l'extrait aqueux de *M. rotundifolia*.

L'analyse des poumons a permis au contraire d'observer la présence d'une congestion des vaisseaux pulmonaires chez les rats traités à la dose de 600 mg/kg de l'extrait étudiés (Figure 10 (D)). Ceux traités à la dose de 300 mg/kg n'ont présenté aucune anomalie au niveau des poumons.

L'examen a permis aussi de noter la présence d'une pulpe blanche et rouge congestive au niveau de la rate pour les deux lots traités (Figure 12 (C)).

Tableau 15 : Effet de l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* sur le poids des organes prélevés chez les rats après 90 jours de traitement par voie orale.

Organes	Témoin	Extrait aqueux de <i>Mentha rotundifolia</i>	
		300 mg/kg	600 mg/kg
poumons	1.52 ± 0.21	1.52 ± 0.18	1.49 ± 0.19
Cœur	0.96 ± 0.09	0.94 ± 0.11	0.92 ± 0.08
foie	8.46 ± 0.20	8.56 ± 0.30	8.65 ± 0.16
Reins	0.82 ± 0.05	0.81 ± 0.07	0.79 ± 0.06
Rate	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.04	0.74 ± 0.04



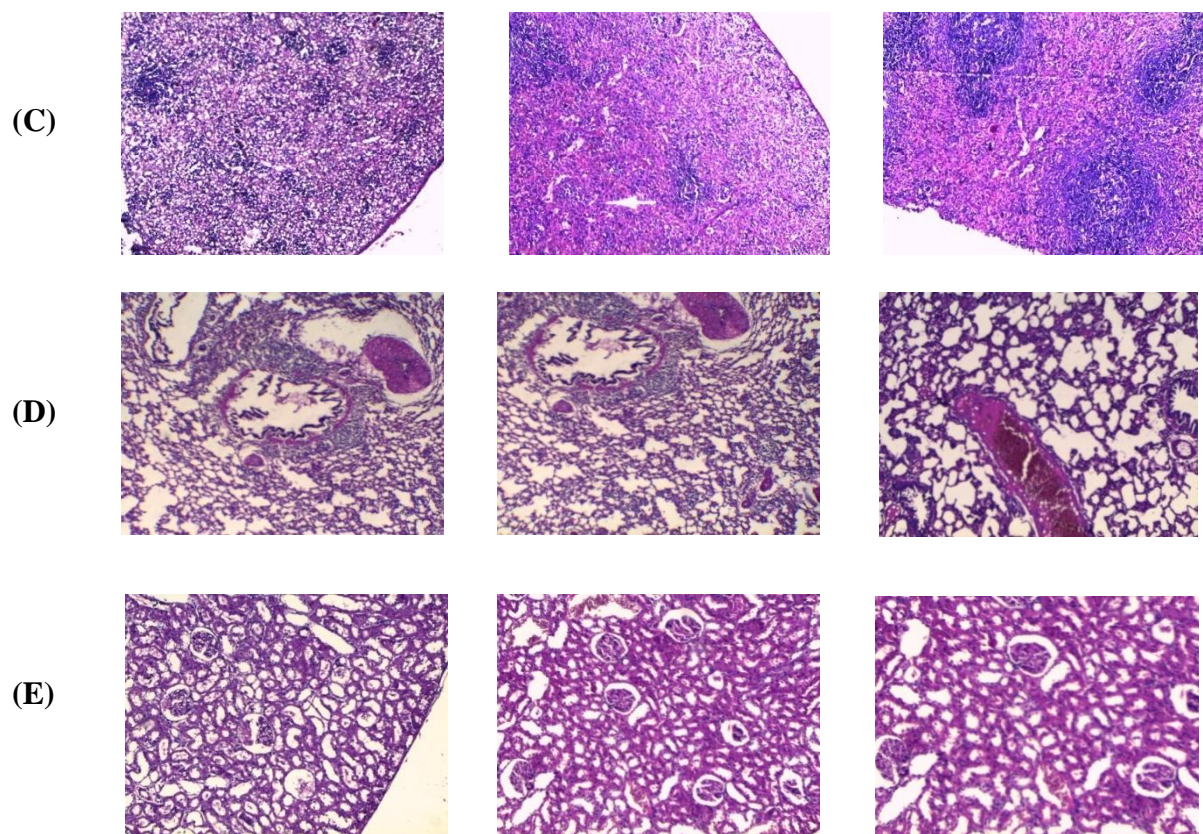


Figure 10 : Microphotographie de cœur (A), foie (B), rate (C), poumons (D), reins (E) des rats traités par l'EAMR aux doses 300 et 600 mg/kg (MR1 and MR2) et des rats témoins (T).

Activités *in Vivo* des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*

I. Activité psychotrope

Les résultats des effets sédatifs des huiles essentielles des deux plantes étudiées sont exprimés par rapport au lot témoin et par rapport au lot de référence. Les tests pharmacologiques sont réalisés aux doses 100, 200, 400 et 500 mg/kg pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et 100, 300, 500 et 700 mg/kg pour l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* par voie orale.

I.1. Test de la traction

Les animaux traités par l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (100 mg/kg ; VO) réalisent un rétablissement normal immédiat (Tab. 16 et 17) ($p < 0,001$). Ceci justifie que les deux huiles essentielles n'ont pas d'action sédatif à cette dose. Aux doses (400 et 500 mg/kg ; VO) pour l'HEMO et (300, 500 et 700 mg/kg ; VO) pour l'HEMR, la moyenne du temps de rétablissement augmente par rapport au lot témoin et au seuil de 5 secondes. Ce qui confère aux huiles essentielles des deux plantes étudiées un effet sédatif d'une façon significatif ($p < 0,001$) à partir de la dose 300 mg/kg (Tab.16 et 17).

I.2. Test de la cheminée

Les deux huiles étudiées à 100 mg/kg ; VO, ne provoquent pas d'effet sédatif mais à la dose 500 mg/kg ; VO, tous les animaux perdent l'initiative et la curiosité ($p < 0,001$) (Tab. 16 et 17). Les souris demeurent incapables de remonter le tube ce qui permet de mettre en évidence la sédation (perte d'initiation et la curiosité).

I.3. Test de la planche à trous

Dans ce test l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (100 mg/kg ; VO) ne réduit pas le nombre cumulatif des trous explorés (en relation avec leur curiosité). Par contre, l'administration orale de l'huile essentielle de la mélisse aux doses 200, 400 et 500 mg/kg, et celle de la menthe aux doses 300, 500 et 700 mg/kg réduit le nombre cumulatif des trous explorés ($p < 0,001$) (Tab. 16 et 17).

Ces données mène à conclure que les deux huiles étudiées ont réduit de manière significative le nombre de trous explorés, ainsi que l'activité locomotrice des animaux, ce qui suggère l'existence d'un effet sédatif.

I.4. Test rota-Rod

Les résultats du test rota Rod sont regroupés dans les tableaux 18 et 19. Après 30 min de l'administration orale des huiles essentielles de la mélisse et de la menthe, le temps moyen de l'animal sur la barre diminue d'une façon significative ($p < 0,001$). 1h et 2h après l'administration de ces huiles, la capacité des souris à rester sur la barre diminue.

Ce test révèle que le Bromazépam et les huiles étudiées aux différentes doses (200, 400 et 500 mg/kg ; VO) ont modifié de manière importante le comportement des animaux par rapport au lot témoin.

Alors que, les extraits aqueux des deux plantes étudiées *Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia* en regroupant les tests de la traction, de la cheminée et de la planche à trous n'ont induit aucune action sédatrice aux doses 500, 700 et 800 mg / kg par voie orale ($p < 0.001$).

D'après tous ces résultats, on peut suggérer que les huiles essentielles de *Melissa officinalis* L. et de *Mentha rotundifolia* exercent un effet sédatif sur le SNC.

Tableau 16 : Action sédatrice de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, $p < 0,001$ par rapport au lot témoin.

Tests comportementaux	Témoin	Bromazépam 20mg/kg; VO	Huile essentielle de <i>Melissa officinalis</i> en (mg/kg ; VO)			
			100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	500 mg/kg
Traction	0.1 sec \pm 0.0 n=5	10 sec \pm 0.3* n=5	0.09sec \pm 0.02 n=5	4 sec \pm 0.2* n=5	7 sec \pm 0.2* n=5	14 sec \pm 0,8* n=5
Cheminée	6 sec \pm 0.5 n=5	> 2 min* n=5	9 sec \pm 0.07 n=5	30 sec \pm 1* n=5	53 sec \pm 0.2* n=5	> 2 min* n=5
Planche à trous	7 \pm 1 n=5	0 \pm 0.0* n=5	5 \pm 0.2 n=5	2 \pm 0.0* n=5	0.4 \pm 0.0* n=5	0 \pm 0.0* n=5

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 17 : Action sédatrice de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, $p < 0,001$ par rapport au lot témoin.

Tests comportementaux	Témoin	Bromazépam 20mg/kg; VO	Huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> en mg/kg ; VO			
			100 mg/kg	300 mg/kg	500 mg/kg	700 mg/kg
Traction	0.1 sec \pm 0.0 n=5	10 sec \pm 0.3* n=5	1 sec \pm 0.01 n=5	5 sec \pm 0.2* n=5	8 sec \pm 0.2* n=5	15 sec \pm 0,8* n=5
Cheminée	6 sec \pm 0.5 n=5	> 2 min* n=5	9 sec \pm 0.07 n=5	45 sec \pm 1* n=5	> 2 min* n=5	> 2 min* n=5
Planche à trous	7 \pm 1 n=5	0 \pm 0.0* n=5	7 \pm 0.2 n=5	5 \pm 0.0 n=5	3 \pm 0.0* n=5	0 \pm 0.0* n=5

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 18 : Comportement des souris sur la tige tournante après administration orale de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et Bromozépam (20 mg/kg). Les résultats sont présentés en secondes (moyennes \pm écart types), n= 5 souris par lot. $p < 0,001$

Lots traités	Dose mg/kg	Temps en secondes		
		30 min	60 min	120 min
Témoin		120 \pm 0	120 \pm 0	120 \pm 0
HEMO (VO)	200	22,4 \pm 4,6*	20,6 \pm 1,9*	13,6 \pm 1,6*
	400	24 \pm 3,1*	18,2 \pm 2,1*	2,6 \pm 0,4*
	500	04 \pm 0,7*	2,8 \pm 0,9*	01 \pm 0,5*
Bromazépam (VO)	20	1,2 \pm 0,9*	01 \pm 0,4*	00 \pm 0*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 19 : Comportement des souris sur la tige tournante après administration orale de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* et Bromozépam (20 mg/kg). Les résultats sont présentés en secondes (moyennes \pm écart types), n= 5 souris par lot. $p < 0.001$

Lots traités	Dose mg/kg	Temps en secondes		
		30 min	60 min	120 min
Témoin		120 \pm 0	120 \pm 0	120 \pm 0
HEMR (VO)	300	60 \pm 7,6*	45 \pm 3,9*	43 \pm 4,6*
	500	34 \pm 3,1*	28,6 \pm 2,1*	12,6 \pm 1,4*
	700	03 \pm 0,3*	02 \pm 0,6*	00 \pm 0*
Bromazépam (VO)	20	1,2 \pm 0,9*	01 \pm 0,4*	00 \pm 0*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

II. Activité anti-inflammatoire

II.1. Œdème à la carragénine

Lors de l'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* contre l'inflammation induit par la carragénine, les différences de volumes entre la patte gauche et la patte droite des animaux témoins et traités sont reportées dans les tableaux 20 et 21. L'injection sous plantaire de carragénine au lot témoin entraîne une augmentation significative du volume moyen de l'œdème de 0.17, 0.26 et 0.34 ml respectivement à 1h30min, 3h00 et 6h00 avec un maximum à 6h00. L'administration orale de médicament de référence l'indométacine à la dose de 10 mg/kg réduit de façon significative l'augmentation du volume de la patte gauche avec un volume de 0.04, 0.07 et 0.16 ml à 1h30min, 3h00 et 6h00 après l'injection de la carragénine. Les extraits des deux plantes administrée par voie orale aux doses 200 et 400 mg/kg pour l'huile essentielle et pour l'extrait aqueux (300 et 600 mg/kg), induit une diminution de volume de l'œdème par rapport au témoin à 1h30min, 3h00 et 6h00 ce qui suggère que les deux plantes ont une action anti-inflammatoire.

Tableau 20 : Effet anti inflammatoire de *Melissa officinalis* L. sur l'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte arrière chez le rat.

Groupes de traitement n=6	Dose mg/kg VO	Variation de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par la carragénine (ml)		
		1h30	3h	6h
Témoin		0.17 ± 0.013	0.26 ± 0.01	0.34 ± 0.023
Indométacine	10	0.04 ± 0.004*	0.07 ± 0.005*	0.16 ± 0.008*
HEMO	200	0.05 ± 0.009*	0.1 ± 0.011*	0.13 ± 0.01*
HEMO	400	0.04 ± 0.01*	0.09 ± 0.008*	0.1 ± 0.013*
EAMO	300	0,107 ± 0.005*	0.09 ± 0.008*	0.15 ± 0.009*
EAMO	600	0.08 ± 0.007*	0.07 ± 0.009*	0.12 ± 0.005*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 21 : Effet anti inflammatoire de *Mentha rotundifolia L.* sur l'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte arrière chez le rat.

Groupes de traitement n=6	Dose mg/kg VO	Variation de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par la carragénine (ml)		
		1h30	3h	6h
Témoin		0.17 ± 0.013	0.26 ± 0.01	0.34 ± 0.023
Indométacine	10	0.04 ± 0.004*	0.07 ± 0.005*	0.16 ± 0.008*
HEMR	200	0.077 ± 0.005*	0.1 ± 0.0*	0.15 ± 0.004*
HEMR	400	0.04 ± 0.005*	0.06 ± 0.004*	0.11 ± 0.004*
EAMR	300	0.08 ± 0.006*	0.09 ± 0.005*	0.11 ± 0.005*
EAMR	600	0.05 ± 0.00*	0.07 ± 0.005*	0.10 ± 0.008*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Les pourcentages d'inhibition représentent la différence de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) \pm erreur standard moyenne (moyenne \pm S.E.M); $P \leq 0,001$ par rapport au témoin et au médicament de référence (indométacine 10 mg/kg ; VO). Les huiles essentielles à la dose (400 mg/kg ; VO) et les extraits aqueux à la dose (600 mg/kg ; VO) de MO et de MR possèdent une activité anti-inflammatoire significative à 3h00 avec un pourcentage d'inhibition de 65.38 % (HEMO) et 76.92% (HEMR) et les extraits aqueux des deux plantes sont similaire à celui de l'indométacine (figures 11 et 12). A 6h chaque extrait des deux plantes étudiées montre une inhibition importante allant de 55.88% jusqu'au 70.58% en comparant au produit de référence l'indométacine qui inhibe la formation de l'œdème avec un pourcentage de 52.94% (figure 11 et 12). Les extraits de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* agissent à la première heure, ce qui justifie l'effet des deux plantes étudiées sur la phase initiale de l'inflammation. Cette réduction de l'œdème est maintenue durant toute la durée de l'expérimentation avec les différents extraits.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que les extraits des deux plantes possèdent une activité anti-inflammatoire significative durant les trois phases de l'inflammation.

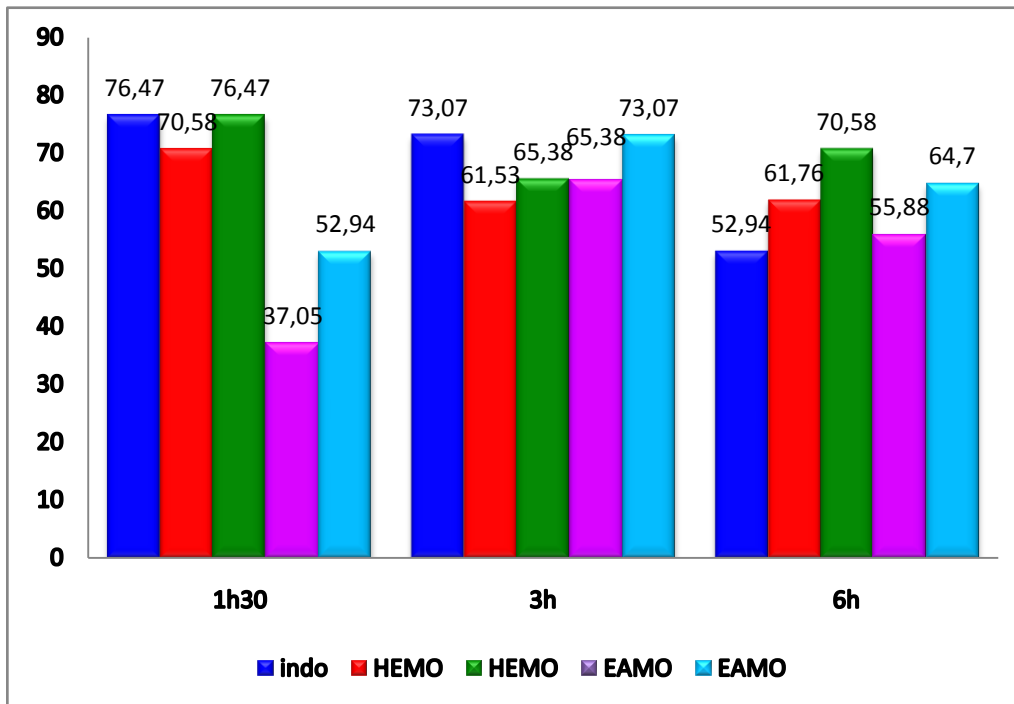


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*

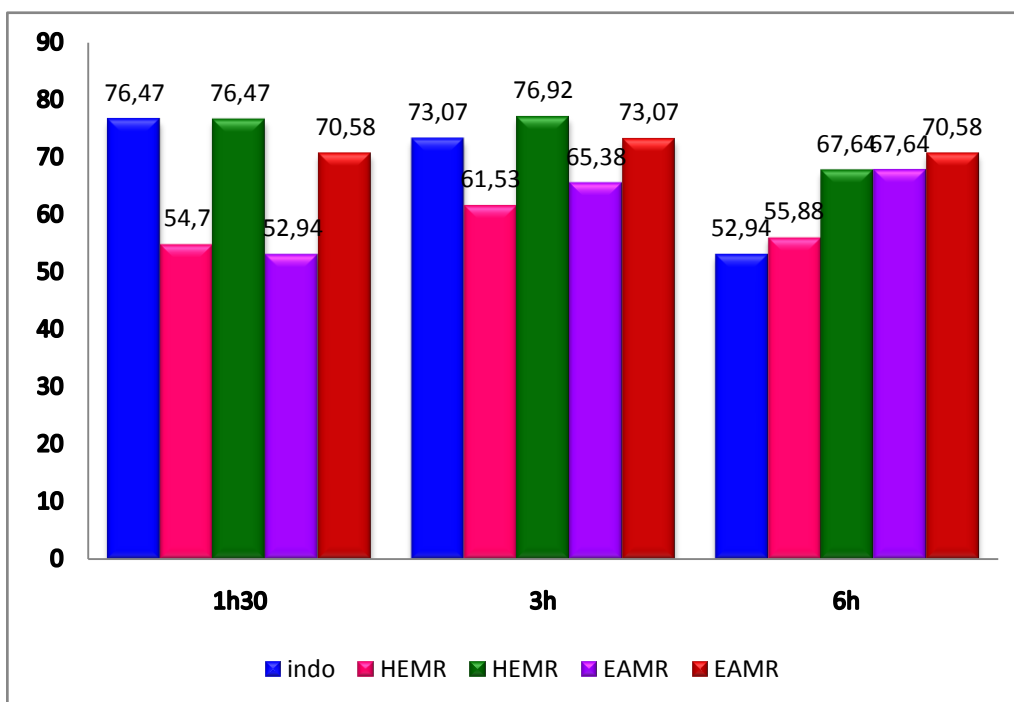


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*

II.2. Œdème par traumatisme expérimental

Les effets des huiles essentielles et des extraits aqueux sur l'œdème induit par traumatisme expérimental chez le rat sont représentés sur les Figure 13, 14 et les Tableaux 22, 23. Les résultats obtenus sont comparables à ceux du témoin et à ceux de l'indométacine (20 mg/kg). Le choc traumatique sur la patte postérieure gauche chez le lot témoin entraîne une augmentation significative du volume moyen de l'œdème de 0.153, 0.22 et 0.36 ml respectivement à 1h30, 3h00 et 6h00. L'indométacine est l'anti-inflammatoire non stéroïdien de référence, administré par VO à une dose de 20 mg/kg réduit significativement ($p < 0.001$) cette augmentation du volume de l'œdème de 0.04, 0.03 et 0.03 ml respectivement à 1h30, 3h00 et 6h00.

A 6h00, Le traitement des rats par l'huile essentielle (400 mg/kg) ou par l'extrait aqueux (600 mg/kg) de la mélisse induit une diminution très significative ($p < 0,001$) de l'inflammation par rapport aux rats du lot témoin. Le volume de l'œdème est de 0.02 ml ce qui signifie une inhibition de 94.44 % (tableau 22 et figure 13). Cette inhibition est significativement ($p < 0,001$) supérieur à celle de l'indométacine 91.66 % (figure 13).

Tableau 22 : Effet anti inflammatoire de *Melissa officinalis L.* sur l'œdème induit par traumatisme au niveau la patte arrière chez le rat.

Groupes de traitement n=6	Dose mg/kg v.o.	Variation de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par la carragénine (ml)		
		1h30	3h	6h
Témoin		0.153 ± 0.005	0.22 ± 0.021	0.36 ± 0.015
Indométacine	10	0.04 ± 0.009*	0.03 ± 0.01*	0.03 ± 0.01*
HEMO	200	0.085 ± 0.005*	0.05 ± 0.007*	0.03 ± 0.005*
HEMO	400	0.068 ± 0.004*	0.04 ± 0.004*	0.02 ± 0.005*
EAMO	300	0.09 ± 0.009*	0.07 ± 0.01*	0.04 ± 0.008*
EAMO	600	0,053 ± 0.005*	0.03 ± 0.005*	0.02 ± 0.009*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 23 : Effet anti inflammatoire de *Mentha rotundifolia L.* sur l'œdème induit par traumatisme au niveau la patte arrière chez le rat.

Groupes de traitement n=6	Dose mg/kg VO	Variation de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par la carragénine (ml)		
		1h30	3h	6h
Témoin		0.153 ± 0.005	0.22 ± 0.021	0.36 ± 0.015
Indométacine	10	0.04 ± 0.009*	0.03 ± 0.01*	0.03 ± 0.01*
HEMR	200	0.115 ± 0.005*	0.07 ± 0.005*	0.04 ± 0.00*
HEMR	400	0.08 ± 0.004*	0.05 ± 0.005*	0.02 ± 0.005*
EAMR	300	0.137 ± 0.005	0.08 ± 0.005*	0.05 ± 0.008*
EAMR	600	0.08 ± 0.005*	0.04 ± 0.005*	0.04 ± 0.011*

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

L'influence des extraits de la menthe sur le volume de la patte postérieure gauche induit par traumatisme expérimental est importante pendant la deuxième et la troisième phase de l'inflammation, elle a été quantifiée par le test d'ANNOVA. La variation du volume de patte PG-PD des rats prétraités par l'huile essentielle (400 mg/kg ; VO) par rapport au lot témoin est de 0.08, 0.05 et 0.02 ml respectivement à 1h30, 3h00 et 6h00. Et les rats prétraités par l'extrait aqueux (600 mg/kg ; VO), cette variation du volume PG-PD est de 0.08, 0.04 et 0.04ml révélant ainsi une action anti-inflammatoire sur l'œdème induit par traumatisme expérimental. Ces résultats suggèrent que les deux extraits de la plante exercent un effet significatif.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que les huiles essentielles et les extraits aqueux de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* administré par VO possèdent une activité anti-inflammatoire. Le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *M. officinalis* à la dose 400 mg/kg est de 81.81 et 94.44 % à 3h et 6h respectivement. Et de 86.36 et 94.44 % pour l'extrait aqueux à la dose 600 mg/kg, à $p < 0.001$, ces résultats sont similaire et supérieur à celui de l'indométacine (figure 13).

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de la mélisse et de la menthe, nous a permis de confirmer son action sur la phase aiguë et la troisième phase de l'inflammation. Les extraits des deux plantes étudiées présentent un faible effet anti-inflammatoire sur la phase initiale de l'inflammation.

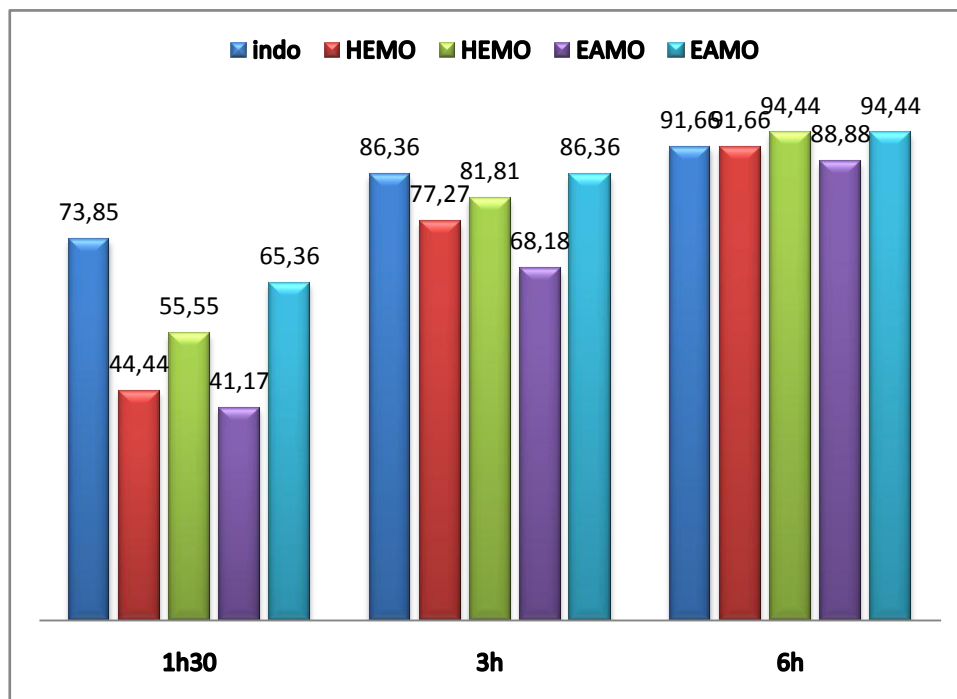


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*.

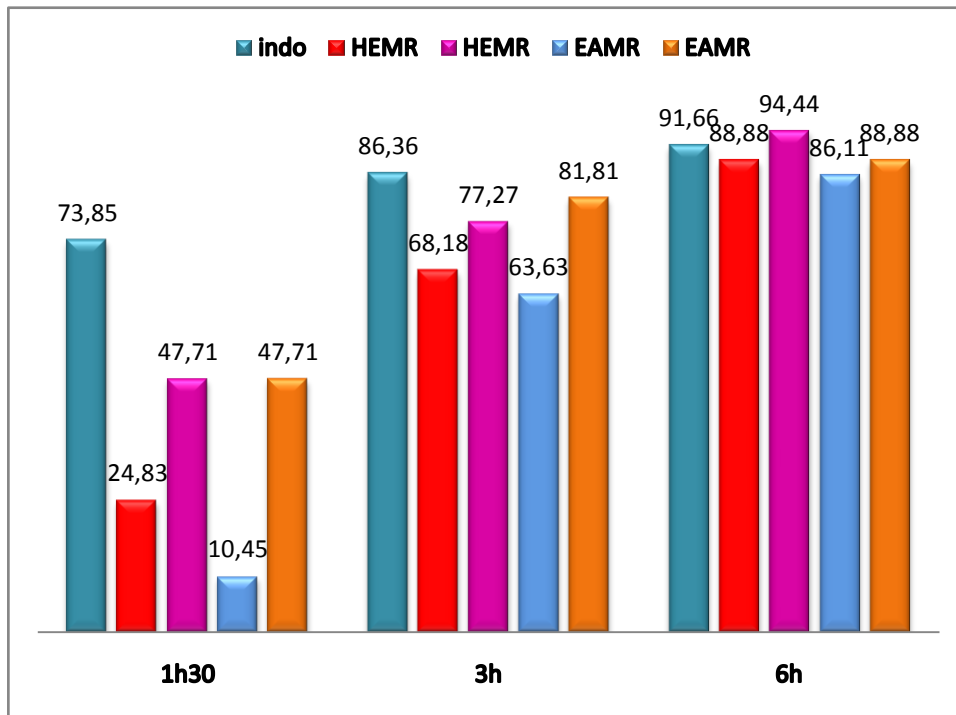


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du volume de patte postérieure gauche chez les rats prétraités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia*

III. Activité analgésique

III.1. Test de Koster

La réponse nociceptive est représentée dans les tableaux 24 et 25, indiquant le nombre de crampes effectuées par l'animal suite à l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique, son écart type et le pourcentage d'inhibition des crampes. Les résultats de ce test montrent que le nombre de crampes induites par l'acide acétique a été significativement ($p < 0,001$) réduit par les huiles essentielles et les extraits aqueux des deux plantes étudiées (Tableau 24 et 25) administrés par voie orale. Nous avons remarqué cet effet d'une façon plus importante que celui du référence (l'acide acétyle salicylique 200 mg/kg ; VO). Les huiles essentielles des deux plantes à la dose 400 mg/kg possèdent une activité antinociceptive maximale et qui peut atteindre 90.76 % d'inhibition de la réaction de l'animal face au stimulus nociceptif chimique (Tableau 24). Les extraits aqueux à la dose 600 mg/kg ; VO des deux plantes étudiées (MO et MR) ont réduit significativement le réflexe des crampes induit par l'AA avec un pourcentage de 69.64 % et 80.2 % respectivement.

Tableau 24 : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits de *Melissa officinalis* au test de Koster

Groupes de traitement n=6	Dose (mg/kg ; VO)	Nombre des crampes (20 min)	% d'inhibition
Témoin		50.5 ± 2.81	
Aspirine (AAS)	200	24.33 ± 2.87	51.81
HEMO	200	14.5 ± 1.87	71.28
HEMO	400	4.66 ± 1.03	90.76
EAMO	300	19.66 ± 1.86	61.06
EAMO	600	15.33 ± 1.75	69.64

Tableau 25 : Pourcentage d'inhibition de la réponse nociceptive des extraits de *Mentha rotundifolia* au test de Koster

Groupes de traitement n=6	Dose (mg/kg ; VO)	Nombre des crampes (20 min)	% d'inhibition
Témoin		50.5 ± 2.81	
Aspirine (AAS)	200	24.33 ± 2.87	51.81
HEMR	200	21.16 ± 1.16	58.1
HEMR	400	8 ± 0.63	84.16
EAMR	300	13.33 ± 1.63	73.60
EAMR	600	10 ± 0.63	80.2

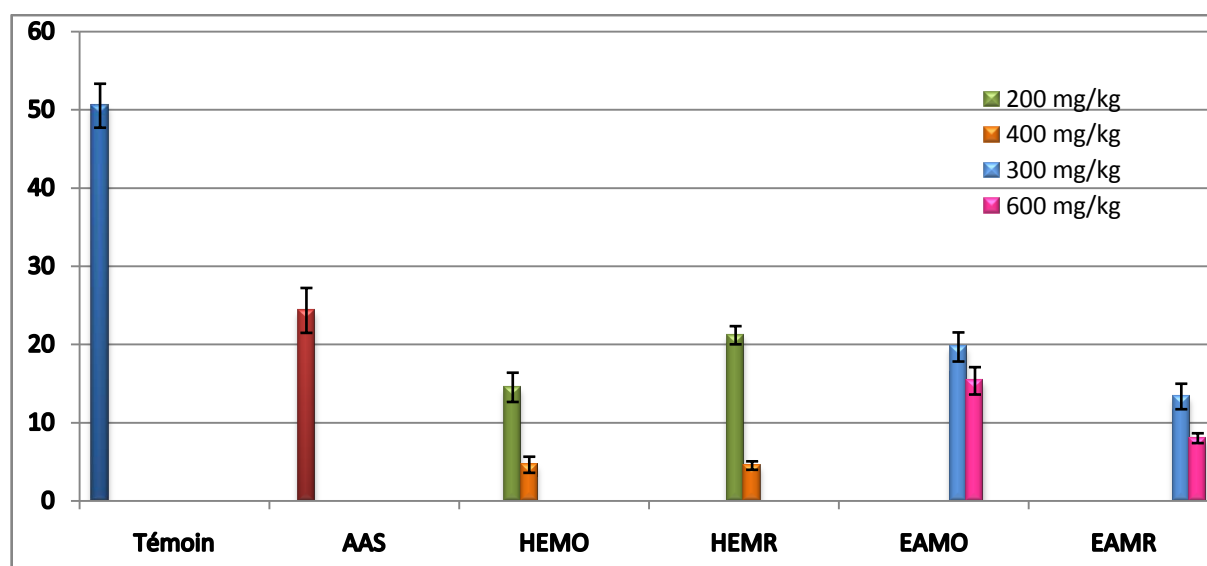


Figure 15 : Effet des extraits de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* sur le nombre de crampes effectuées par la souris après injection de l'acide acétique au test de Koster.

HEMO : huile essentielle *Melissa officinalis*, HEMR : huile essentielle *Mentha rotundifolia*, EAMO : extrait aqueux *Melissa officinalis*, EAMR : extrait aqueux *Mentha rotundifolia*, AAS : acide acétyl salicylique.

III.2. Test de Tail-Flick

Les résultats du test de Tail Flick regroupés dans les tableaux 26 et 27 reflétant l'action analgésique centrale de l'extrait aqueux (300 et 600 mg/kg ; VO) et de l'huile essentielle (200 et 400 mg/kg ; VO) de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*, ils représentent le temps moyen de réflexe de retrait de la queue et son écart type standard à 15, 30, 45, 60 et 120 min. Ces résultats montrent que le traitement des rats avec les huiles essentielles des deux plantes étudiées, a augmenté le temps de réaction au stimulus thermique nociceptif (les temps de latence de retrait de la queue de la chaleur des rats traités sont plus grands que ceux des rats témoins). Cet effet antinociceptif commence à partir de 30 min et persiste tout au long de l'expérimentation avec un effet maximal à 45 min pour l'huile essentielle de *M. rotundifolia* aux doses 200 et 400 mg/kg respectivement, 8.25 ± 0.08 et 9.42 ± 0.29 sec. Le pic de l'action (8.74 et 9.26 sec) est observé à 60 min pour l'huile essentielle de *M. officinalis*. L'extrait aqueux à la dose 600 mg/kg de la mélisse et de la menthe a augmenté significativement ($p < 0.001$) le temps de réaction respectivement 6.73 ± 0.89 et 8.08 ± 0.55 sec à 45 min d'une façon comparable à la morphine (5 mg/kg, SC.), le temps de latence au stimulus nociceptif était de 7.58 ± 0.09 sec (tableaux 26 et 27). Tous ces effets qui ont été observés, sont presque semblables et comparable à l'effet de la morphine.

Tableau 26 : Influence des extraits de *Melissa officinalis* et de la morphine (M), vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur chez le rat (test de Tail-Flick).

	<i>Melissa officinalis</i>					
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min
Témoin	$2,82 \pm 0,09$	$2,92 \pm 0,05$	$2,17 \pm 0,07$	$2,33 \pm 0,13$	$2,07 \pm 0,05$	$2,86 \pm 0,06$
Morphine	$2,1 \pm 0,19$	$3,01 \pm 0,18$	$5,6 \pm 0,19^*$	$7,58 \pm 0,09^*$	$5,18 \pm 0,19^*$	$3,1 \pm 0,23$
HEMO 200	$2,24 \pm 0,69$	$3,75 \pm 0,29$	$5,02 \pm 0,2^*$	$7,26 \pm 0,07^*$	$8,74 \pm 0,25^*$	$6,29 \pm 0,34^*$
HEMO 400	$2,65 \pm 0,28$	$4,61 \pm 0,48$	$5,11 \pm 0,07^*$	$8,27 \pm 0,2^*$	$9,26 \pm 0,3^*$	$7,75 \pm 0,37^*$
EAMO 300	$2,36 \pm 0,65$	$3,89 \pm 0,53$	$3,33 \pm 0,34$	$6,5 \pm 0,61^*$	$5,57 \pm 0,45^*$	$3,87 \pm 0,77$
EAMO 600	$2,14 \pm 0,4$	$4,58 \pm 0,43$	$3,45 \pm 0,9$	$6,73 \pm 0,89^*$	$5,67 \pm 0,25^*$	$4,76 \pm 0,22$

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Tableau 27 : Influence des extraits de *Mentha rotundifolia* et de la morphine (M), vis-à-vis de la douleur induite par la chaleur chez le rat (test de Tail flick).

	<i>Mentha rotundifolia</i>					
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min
Témoin	2,82 ± 0,09	2,92 ± 0,05	2,17 ± 0,07	2,33 ± 0,13	2,07 ± 0,05	2,86 ± 0,06
Morphine	2,1 ± 0,19	3,01 ± 0,18	5,6 ± 0,19*	7,58±0,09*	5,18±0,19*	3,1 ± 0,23
HEMR 200	2,07 ± 0,43	3,62 ± 0,33	5,23±0,25*	8,25±0,08*	7,22±0,28*	7,58 ±0,31*
HEMR 400	2,37±0,33	3,4±0,46	6,1±0,1*	9,42±0,29*	8,35±0,27*	7,49±0,23*
EAMR 300	2,13 ± 0,42	2,65 ± 0,29	3,4 ± 0,48	7,58±0,39*	5,59±0,53*	3,08 ± 0,17
EAMR 600	2,02 ± 0,41	3,01 ± 0,05	4,01 ± 0,02	8,08±0,55*	5,74±0,25*	3,44 ±0,37

* $p < 0,001$ par rapport aux témoins

Activités *in Vitro* des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*

I. Activité antioxydante

Dans le cadre de la recherche d'autres activités biologiques de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*, nous avons procédé à l'évaluation de son pouvoir antiradicalaire avec le DPPH, son pouvoir réducteur (FRAP) et son pouvoir antioxydant par ABTS.

I.1. Piégeage du radical libre DPPH

Dans un premier temps nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits par le test du radical DPPH qui permet de mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite avec une perte de la couleur violette. La décoloration sera proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de MO et de MR étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition et la concentration inhibitrice 50 du radical DPPH par les extraits et sont représentés graphiquement (Figure 16 et 17).

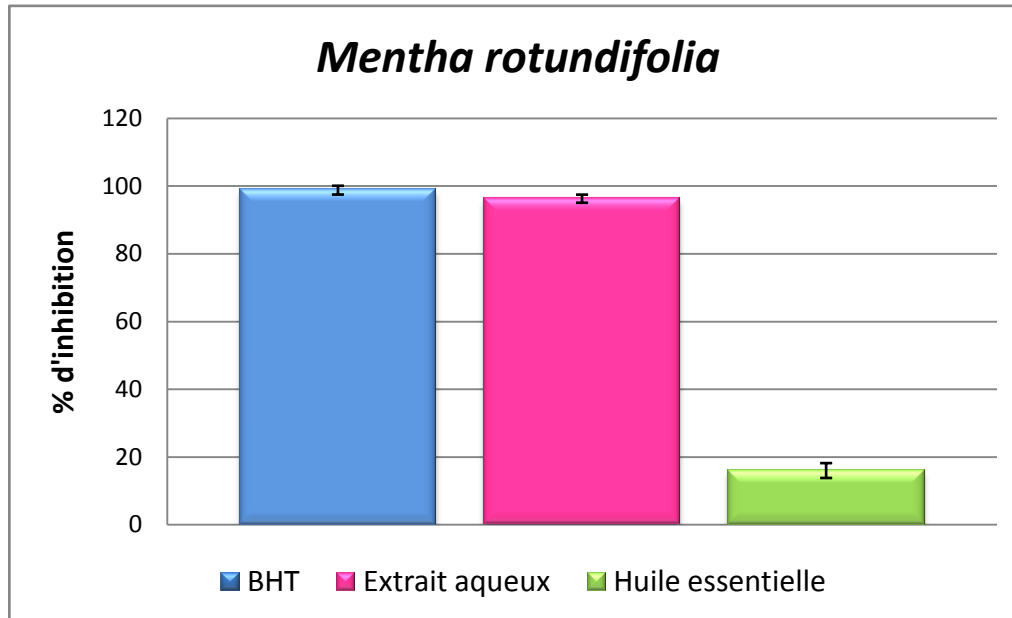


Figure 16 : Activité antiradicalaire du DPPH : pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*.

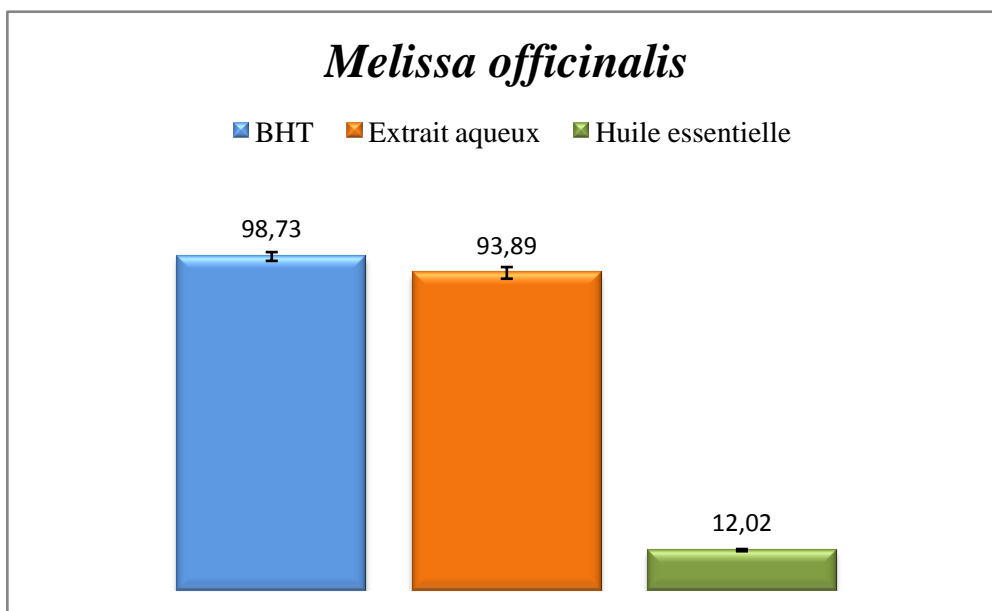


Figure 17 : Activité antiradicalaire du DPPH : pourcentage de l'inhibition de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*.

Nous constatons que les extraits aqueux des deux plantes présentent un très bon pouvoir antioxydant. En effet, à la concentration de 100 µg/ml les extraits testés réduisent plus de 90% du radical DPPH, MO est inhibé avec 93.89 ± 1.72 % et MR avec 96.20 ± 1.2 %. Activité comparable ou similaire à celle du témoin positif, le BHT qui est inhibé avec 98.73 ± 1.3 %. Tandis que pour les huiles essentielles, nous n'avons trouvé qu'une faible inhibition (12.02 ± 0.32 % pour *M. officinalis* et 15.93 ± 2.2 % pour *M. rotundifolia*).

L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Les résultats obtenus (Tableau 28) montrent que l'extrait aqueux présente un effet antioxydant très important vis à vis du radical DPPH. En effet, La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC₅₀) est de 32.36 ± 0.8 µg/ml pour l'extrait aqueux de MO, 28.75 ± 0.04 µg/ml pour l'extrait aqueux de MR, et 6.1 ± 0.6 µg/ml pour le BHT. Tandis que, l'huile essentielle des deux plantes a un IC₅₀ très élevé.

Tableau 28 : Activité antiradicalaire du DPPH : IC₅₀ de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*.

Les extraits	IC ₅₀ µg/ml
EAMO	32.36 ± 0.8
EAMR	28,75 ± 0,04
HEMO	1750,36 ± 32,34
HEMR	1625,75 ± 28.3
BHT	6,1 ± 0,6

Ce pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux est expliqué par la présence des composés phénoliques notamment les flavonoïdes présents dans les deux plantes étudiées, et qui sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène.

I.2 Pouvoir réducteur du fer

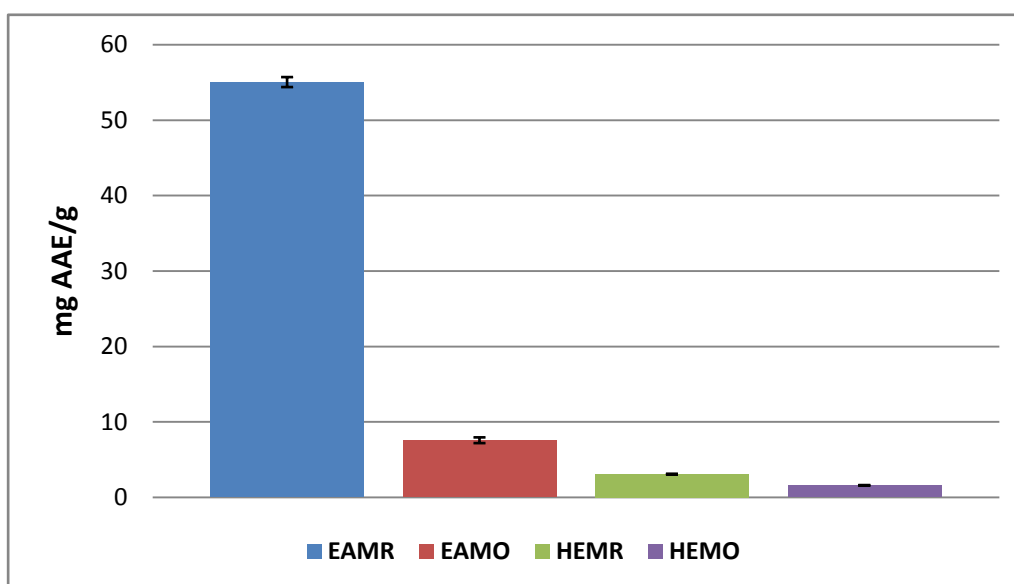


Figure 18 : Pouvoir réducteur du fer des extraits de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* chaque point représente la moyenne n=3 (les moyennes sont significativement différentes P<0.001)

Les résultats d'activité réductrice exprimés en AAE montrent clairement que l'extrait aqueux présente le pouvoir de réduire l'ion Fe^{+3} le plus intéressant (le potentiel antioxydant le plus fort), et le pouvoir réducteur du fer de *M. rotundifolia* est plus grand que celle de *M. officinalis*. Par contre l'huile essentielle possède un pouvoir réducteur trop faible. Ces résultats pourront être expliqués que l'extrait aqueux et surtout de *M. rotundifolia* présente un pouvoir réducteur important renferme des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort (figure 18).

I.3. Pouvoir antioxydant par ABTS

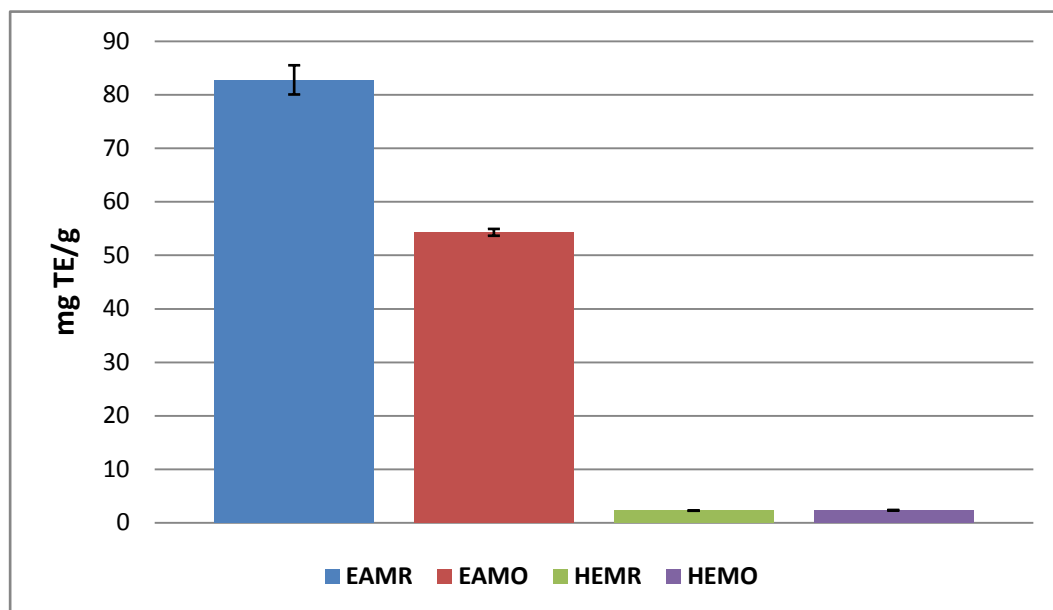


Figure 19 : Capacité antioxydante en équivalence de Trolox par l'ABTS des extraits de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*, chaque point représente la moyenne n=3 (les moyennes sont significativement différentes $P < 0.001$)

L'activité antioxydante des extraits exprimés en TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de Trolox. Les résultats de l'activité antioxydante du test de l'ABTS sont 82.77 ± 2.73 mg TE/g et 54.27 ± 0.64 mg TE/g pour l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* et *M. officinalis* respectivement et environ 2 mg TE/g pour l'huile essentielle des deux plantes. Les résultats d'activité réductrice exprimés en TEAC montrent clairement que l'extrait aqueux présente le pouvoir antioxydant le plus puissant vis-à-vis du radical de l'ABTS (figure 19).

II. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles ont été évalués pour l'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram négatif (*E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* et *E. cloacea*) et Gram positif (*S. pneumoniae* et *S. aureus*). Les résultats des tests d'inhibition de l'activité microbienne sont illustrés dans le tableau 29. Nous avons comparé l'effet microbien de l'huile essentielle de deux plantes. En effet, l'huile essentielle de la mélisse s'est avéré le plus actif contre toutes les souches bactériennes.

Le diamètre de la zone d'inhibition de l'huile essentielle de la mélisse variait de 20 à 46 mm, tandis que le DZI de l'huile essentielle de la menthe variait de 20 à 29 mm ($P < 0,001$) (Tab. 29). Les résultats obtenus indiquent que les deux huiles possèdent un effet inhibiteur. Le meilleur résultat obtenu est celui de l'huile essentielle pur de *M. officinalis* avec un diamètre d'environ 46 mm par rapport à *M. rotundifolia* avec un diamètre de 29 mm vis-à-vis *S. aureus*.

Les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, et 1/16 ont donnés des zones d'inhibition inférieur à 28 mm ce qui explique que la dilution diminue l'effet des huiles essentielles, donc l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles.

Les huiles essentielles de deux espèces ont montré de bonnes activités, inhibant la croissance des bactéries Gram négatif avec des DZI allant de 6 à 29 mm, mais avec plus d'activité contre les bactéries Gram positif avec des DZI allant de 6 à 46 mm. Les bactéries Gram positifs sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram négatifs.

Les résultats présentés dans cette étude mettent en évidence le potentiel des huiles en tant que source de composés modifiants la résistance aux antibiotiques.

En général, les deux huiles essentielles possèdent une activité antimicrobienne avec plus d'activité pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis*. De cette étude analytique d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes, on peut conclure:

- Toutes les souches bactériennes étudiées sont sensibles à ces huiles essentielles ;
- Cette sensibilité est différente selon les souches. Les souches très sensibles, les souches moyennement sensibles et les souches moins sensibles ;
- L'huile essentielle de *Melissa officinalis* est plus active que *Mentha rotundifolia*.

Tableau 29 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*.

Plante Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)									
	<i>Melissa officinalis</i>					<i>Mentha rotundifolia</i>				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
E. coli	20 ± 0	15 ± 0	11 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22 ± 0	20 ± 0	13 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
P. mirabilis	26.33 ± 1.15	16.33 ± 1.15	14 ± 1	8.5 ± 0	6 ± 0	25 ± 0	16.33 ± 1.15	14 ± 0	7.5 ± 0	6 ± 0
P. aeruginosa	22 ± 1.73	14.66 ± 0.57	11 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	20 ± 0	13.66 ± 0.57	11 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
E. cloaceae	29 ± 0	17 ± 0	8 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	21 ± 0	11 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
S. pneumoniae	22.66 ± 0.57	15.66 ± 1.54	13 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	25 ± 1	15.5 ± 0.5	12 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
S. aureus	46.33 ± 1.15	28 ± 1.73	13 ± 0	11 ± 0	9.5 ± 0.12	29 ± 1	15 ± 0	13 ± 0	13 ± 0	7 ± 0

Tableau 30 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'antibiotique et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)	
	Ciprofoxacine (5µg / disque)	DMSO
E. coli	32	6
P. mirabilis	22	6
P. aeruginosa	11	6
E. cloaceae	20	6
S. pneumoniae	12	6
S. aureus	24	6

DISCUSSION ET
CONCLUSION GÉNÉRALE



Discussion et Conclusion Générale

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle. La deuxième fraction non volatile de la plante, est composée essentiellement de flavonoïdes (**Cisowski, 1985**), composés acétyléniques et de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (**Kubeczka et al., 1982**).

L'analyse phytochimique des huiles essentielles et des extraits aqueux est une étape préliminaire et d'une grande importance.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure d'un côté que les deux plantes peuvent présenter un caractère pharmacologique intéressant du fait de leur composition chimique aussi variée et diversifiée. Le criblage phytochimique des extraits aqueux a mis en évidence les composés suivants : les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins et les saponines. La richesse de ces plantes en métabolites secondaires justifie leur grande efficacité en usage thérapeutique traditionnel. Les flavonoïdes sont très abondants dans ces deux plantes, ils sont connus par leur propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires (**Wang and Mazza, 2002**) et analgésiques (**Pathak et al., 1991; Meyre-Silva et al., 1999 ; Bittar et al., 2000**). Il a été également démontré que certains composés flavonoïdiques possèdent des propriétés sédatives, anticonvulsives et immunomodulatrices (**Du et al., 2002 ; Lyu et Park, 2005**). Par ailleurs, les saponosides sont connus par leur effet anti-inflammatoire et antiœdémateux (**Ikegami et al., 2006**). Ils exercent également une action protectrice sur le système nerveux (**Finar, 1956**). Enfin, Les tanins possèdent une forte activité antioxydante, ce sont des très bons piègeurs des radicaux libres et inhibent la formation du radical superoxyde. Et sont tenus comme bons remèdes dans le traitement des maladies respiratoires et contre la toux (**Bouchet et al., 2000**).

D'un autre côté, l'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* nous a permis de conclure la présence de trois composés majoritaires : Nérol, Citral et Isopulégole. Tandis que l'analyse CPG/SM de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* se caractérise essentiellement par une forte teneur en oxyde de pipériténone qui représente le composé majoritaire de cette plante. À la meilleure connaissance des auteurs, le Nérol et le Citral ont été rapporté comme des constituants majeurs de *M. officinalis* (**Vaverkova et al., 2012 ; Bahtiyarca and Cosge, 2006 ; Tihel et al., 1982**) mais l'isopulégol n'a jamais été rapportée comme constituant majoritaire de *Melissa officinalis*. On pourrait dire que l'échantillon de Mélisse représente un nouveau chémotype typique du Maroc. Pour l'huile essentielle de

Mentha rotundifolia, l'oxyde de pipériténone a été rapporté comme constituant caractéristique des huiles volatiles de quelques chémotypes de *Mentha rotundifolia* (Lorenzo et al., 2002 ; Nagell et Hefendehl, 1974). Des travaux antérieurs ont démontré que l'oxyde de pipériténone ne dépasse pas les 30% des huiles essentielles de *M. rotundifolia*. Dans notre étude, cette molécule représente le pourcentage le plus important (54.6 %).

La différence de composition constatée sur les huiles essentielles peut être due à des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui influencent le métabolisme des plantes (Moghtader and Afzali, 2009 ; Derwich et al., 2011).

Melissa officinalis et *Mentha rotundifolia* sont consommées par les marocains sans qu'aucun signe toxique apparent ne soit rapporté. L'évaluation scientifique de cette réputation requière l'étude de l'impact de plante sur l'organisme à long ou à moyen terme. D'où l'étude entreprise de la toxicité chronique.

Avant d'étudier la toxicité chronique, nous avons d'abord déterminé la toxicité aiguë par voie orale de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle des deux plantes *M. officinalis* et *M. rotundifolia*. Nous avons choisi la voie orale car c'est la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour l'Homme. Les résultats obtenus n'ont révélé aucun signe particulier de toxicité chez les souris pendant 14 jours. L'administration orale de tous les extraits à la dose de 2 g/kg du poids de l'animal n'a provoqué aucun cas de mortalité, sauf un seul cas de décès enregistré pour l'huile essentielle de la mélisse. Les animaux ne subissent aucun changement dans l'évolution normale du poids corporel.

Cependant, nous avons observé que les animaux restent immobilisés pendant quelque temps (de 30 min à 1 h suivant la dose) après traitement par les huiles essentielles. Ceci montre qu'à forte dose, les huiles essentielles des deux plantes provoquent une sédation chez les animaux. Nous pouvons donc supposer que les composés des huiles essentielles ont un effet sédatif. La DL₅₀ est de l'ordre de 5000 mg/kg pour les extraits aqueux des deux plantes et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de l'ordre de 2500 mg/kg pour l'huile essentielle de *M. officinalis*. Soient des valeurs relativement élevées témoignant une toxicité très faible, ce qui présage une sécurité d'emploi de ces extraits. Il en résulte que tous les extraits appartiennent à la classe 5 dans le système mondial de classification des substances chimique.

Pour la toxicité chronique, à partir des résultats obtenus nous avons pu faire un certain nombre de constats :

Les rats traités soit par l'huile essentielle de la mélisse ou par l'extrait aqueux de la menthe ont connus une évolution normale du poids corporel, ce qui démontre l'absence de signe de toxicité.

Les organes prélevés à la fin du traitement (reins, foie, cœur, poumons, rate) n'ont connu aucune variation significative de leur poids. L'analyse hématologique n'a révélé aucune modification significative des paramètres déterminés chez les rats traités par l'huile essentielle de *M. officinalis* ou par l'extrait aqueux de *M. rotundifolia*.

L'extrait aqueux de *Mentha rotundifolia* n'a induit aucun changement des paramètres biochimique (ALAT, ASAT, créatinine et l'urée). Cependant, cet extrait a provoqué une diminution significative de glucose au cours de traitement qui devient normal au bout de 90 jours. Cette diminution est probablement due à l'état de sédation qui empêcherait les animaux de se nourrir et de consommer l'eau régulièrement.

Cette étude montre une perturbation de quelques paramètres biochimiques chez les rats traités par l'huile essentielle de *Melissa officinalis*, une diminution significative du taux de glycémie et une augmentation significative de l'urée. Cette augmentation de l'urée pourrait être expliquée par une augmentation de catabolisme des composés protéiques, et par une atteinte de la fonction de mécanisme de filtration rénale. (**Dugan et al., 1989 ; Piva et al., 1997**), et probablement l'exposition chronique de l'HEMO aux différentes doses peut interférer avec la capacité des reins à excréter ce métabolite (**Bailey, 2000**). La diminution du taux du glucose peut être expliquée par une altération de l'action de l'insuline ou a une sécrétion inadéquate de l'insuline (**Emily, 2007**).

L'augmentation de l'urée reflète une lésion cellulaire rénale. Cette élévation a été confirmée par les résultats des analyses histopathologiques qui ont montré chez les rats traités par l'HEMO aux différentes doses (100 et 200 mg/kg) une ischémie glomérulaire et une nécrose tubulaire focale. Ces changements vont interférer avec la capacité du rein à mener normalement ses rôles excréteurs. Cela peut avoir contribué à des niveaux élevés de l'urée dans le sang chez les rats traités par l'HEMO. De plus, le rein est très sensible à des substances toxiques, car un grand volume de sang coule à travers le rein et filtre de grandes quantités de toxines qui peuvent se concentrer dans les tubules rénaux (**Emily, 2007**).

Des modèles spécifiques d'étude de la douleur et de l'inflammation ont été réalisés afin de déceler et d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire et antalgique des extraits de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*.

Le test de Koster est considéré comme un modèle de la douleur viscérale, du fait que la douleur induite par l'acide acétique est similaire à une péritonite (**Le Bars et al., 2001**). Ce test est fréquemment utilisé pour mettre en évidence des substances à effet antalgique périphérique comme les AINS. Avec cette méthode, nos résultats ont montré que l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* aux différentes doses, atténuent très significativement la douleur chimique. Dans ce test, les mécanismes impliqués dans la réaction nociceptive sont liés au métabolisme de l'acide arachidonique et à la biosynthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase (**Duarte et al., 1988 ; Ueno et al., 2001**). Sur la base de ces données, l'effet inhibiteur de la réponse nociceptive à ce stimulus chimique est dû probablement à l'action inhibitrice des extraits testés sur la cyclooxygénase et la libération de prostaglandine. Nous pourrions suggérer que les extraits aqueux et les huiles essentielles agissent au niveau périphérique.

En outre, le test de Tail Flick, est un modèle sensible aux analgésiques centraux en particulier ceux qui ont un site d'action spinal (**Le Bars et al., 2001**). Nous avons étudié l'effet antalgique de l'extrait aqueux (300 et 600 mg/kg ; VO) et de l'huile essentielle (200 et 400 mg/kg ; VO) des deux plantes en utilisant la morphine (5 mg/kg, IP) comme analgésique de référence. Les résultats de ce test ont révélé que les traitements oraux par l'huile essentielle et l'extrait aqueux exercent une forte activité antalgique chez l'animal. Ce qui confirme l'effet analgésique central de ces extraits et tendent à suggérer que ces extraits exercent probablement leur action analgésique centrale en inhibant les récepteurs opioïdes de la douleur centrale.

A l'issu des résultats obtenus de ces deux tests, nous pouvons conclure que tous les extraits testés possèdent un effet antalgique.

De plus, les analgésiques peuvent exercer leur activité antinociceptive au niveau de trois sites distincts (**Lullmann et al., 1991**). Au niveau périphérique par diminution de la sensibilité des nocicepteurs (analgésiques, anti-inflammatoires). Au niveau médullaire par suppression du relais des influx nociceptifs (opioïdes). Et, enfin au niveau supra-spinal par inhibition de la perception de la douleur (opioïdes, narcotiques) ou bien en modulant l'assimilation de la douleur (antidépresseurs comme co-analgésiques).

Pour tenter à prouver si nos extraits possèdent l'effet anti-inflammatoire à côté de l'effet antalgique, nous avons eu recours à deux autres tests, le test de l'œdème de la patte induit par la carragénine et le test de l'œdème de la patte induit par traumatisme.

Le test de l'œdème de la patte est un modèle d'inflammation aigue, il donne des résultats facilement exploitables. Les résultats obtenus à l'issu des tests anti-inflammatoires montrent que les huiles essentielles et les extraits aqueux des deux plantes étudiées inhibent de manière significative le développement de l'œdème de la patte du rat induit par la carragénine (stimulus chimique) ou par traumatisme (stimulus mécanique). L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que tous les extraits possèdent une activité anti-inflammatoire significative durant les trois phases d'inflammation surtout la phase tardive de l'inflammation.

Le mécanisme par lequel la carragénine induit le processus inflammatoire comporte trois phase : Elle stimule la libération de l'histamine et la 5-hydroxytryptamine qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème ; une seconde phase qui fait appel aux kinines comme médiateurs augmentant la perméabilité vasculaire et la phase tardive dont le médiateur est supposé être la prostaglandine (**Wang et Mineshita, 1996**). Cette libération de prostaglandine est associée à la migration leucocytaire dans la zone enflammée. Les prostaglandines interviennent dans les processus inflammatoires.

Les résultats du test anti-inflammatoire ainsi que ceux du test de l'analgésie, nous permettent d'affirmer que les extraits de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* possèdent un effet antalgique et anti-inflammatoire. Ces résultats peuvent traduire la présence de substances actives sur les médiateurs communs à l'inflammation et au processus douloureux comme l'histamine, les prostaglandines ceci est justifié par les travaux de **McGaw et al., 1997**. En effet, Certaines substances sont connues à la fois pour leurs effets antalgique et anti-inflammatoire comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Acide acétyle salicylique et l'indométacine) utilisés comme médicaments de référence dans nos tests (**Famaey, 1983**). D'autres substances par contre sont considérées comme de bons anti-inflammatoires, mais leur effet antalgique est très faible, la phenylbutazone fait partie de ce groupe de composés (**Insel, 1990**). Un troisième groupe de molécules sont de très bon antalgique (périphérique), mais elles ne possèdent aucune propriété anti-inflammatoire, c'est le cas du paracétamol (**Insel, 1990**).

Ces effets anti-inflammatoires et analgésiques peuvent être attribués à la composition chimique de la plante. La richesse des extraits aqueux en constituants polyphénoliques pourraient en partie expliquer ces activités d'où sa capacité de piéger les radicaux libres, empêcherait la formation des prostaglandines qui provoquent l'inflammation. Les tanins et les flavonoïdes contribuent à cet effet anti-inflammatoire, ces composés ont le pouvoir d'inhiber

la production de médiateurs pro-inflammatoires tel que les leucotriènes, et les prostaglandines.

Le citral est le principal composant de l'huile essentielle de *Cymbopogon citrates* stapf. Cette HE a révélée d'être capable de supprimer les IL-1 β et IL-6 dans les macrophages péritonéaux stimulés par le LPS. Un autre travail a révélé que citral inhibe TNF- α dans les cellules RAW 264.7 stimulés par le LPS. L'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. pourrait être expliqué, au moins en raison de présence du citral en tant que composant principal.

Les effets observés avec nos extraits justifient l'utilisation traditionnelle des deux plantes dans le traitement d'inflammation et de la douleur.

Au regard de ces résultats importants, nous avons cherché à compléter le tableau pharmacologique des extraits testés in vivo. Pour cela, nous nous somme intéressés a étudié l'effet sédatif des huiles essentielles et des extraits aqueux de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* sur certains aspects du comportement de l'animal. Quatre tests comportementaux ont été utilisés: la traction, la cheminée, la planche à trou, et la tige tournante.

L'administration par voie orale des huiles essentielles de mélisse et de la menthe induit un effet sédatif. L'huile essentielle de *M. officinalis* à la dose de 500 mg/kg par voie oral a provoqué significativement un effet sédatif, suggérant que le Nérol, le Citral et l'Isopulégol en tant que composants majeurs pourraient en être les principes actifs pharmacologiques, ce qui conforte la littérature qui rapporte que l'isopulégol a un effet sur le système nerveux central (**Maria Izabel, 2007**). La propriété sédative de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* a été mise en évidence par un allongement du temps de rétablissement, une perte de l'initiative et de la curiosité, et une diminution du temps de maintien sur la barre chez les souris.

Les huiles des deux plantes exercent un effet sédatif sur le SNC, comparable à la substance de référence Bromazépam administrée par VO à la dose 20 mg/kg, l'extrait aqueux des deux plantes ne possède pas un effet sédatif.

Le mécanisme de l'activité sédative est basé sur l'inhibition des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Les récepteurs nicotiques d'acétylcholine (nAChR) sont des canaux cationiques ligand-dépendants trouvés dans tout le corps, ils servent de médiateur de diverses fonctions physiologiques. De type musculaire nAChR situés dans la région plaque motrice

des fibres musculaires, ils jouent un rôle essentiel dans la contraction musculaire et dans la fonction motrice.

Par ailleurs, les benzodiazépines sont déprimeurs du système nerveux central, elles sont utilisées pour diminuer l'activité exploratrice de l'animal par leur potentiel sédatif (**Roy-Byrne, 2005**). L'effet sédatif induit par les huiles essentielles aux doses 200, 400 et 500 mg/kg VO est similaire ou plus important que le produit de référence. Les HE ont réduit de manière significative le nombre de trous explorés, ainsi que l'activité locomotrice des animaux. A cet égard, Il est admis que l'activité locomotrice résulte de l'activation du cerveau, et se manifeste par une excitation des neurones incluant différents mécanismes neurochimiques et une augmentation du métabolisme cérébral. Ainsi, il serait possible que cette activité soit médiée par la voie GABA-ergique, la modulation de la transmission GABAergique étant impliquée dans une sédation profonde chez la souris (**Gouttes Mann, 2002**). L'action inhibitrice du GABA consiste en l'ouverture des canaux chlorure pour permettre l'hyperpolarisation de la membrane (**Forte et al., 2010**), entraînant une dépression du SNC et induisant une activité sédatrice.

L'autre volet de notre étude consiste à étudier les activités antioxydante et antibactérienne in vitro de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia*. Dans ce cadre, nous avons testé en premier l'activité antioxydante des extraits aqueux et des huiles essentielles de deux plantes.

Les résultats obtenus par le test DPPH montrent que l'extrait aqueux présente un effet antioxydant remarquable vis à vis du radical DPPH avec une IC_{50} de l'ordre de 28.75 ± 0.04 et $32.36 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ respectivement pour *M. rotundifolia* et *M. officinalis*, par contre la capacité antiradicalaire des huiles essentielles sont très faibles. Nous avons constaté les mêmes résultats pour les deux autres tests ABTS et FRAP, autrement dit, les extraits aqueux exercent un potentiel antioxydant plus importante que celle de l'huile essentielle. Ces résultats suggèrent que l'activité antioxydante des extraits aqueux des deux plantes étudiées peut être corrélée avec leurs teneurs en composés phénoliques. Ces composés sont des constituants des plantes très importants connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Kelly et al., 2002**) ou prévenir la décomposition des hydroperoxydes en radicaux libres (**Pokorny, 2001**). **Bhourri et ses collaborateurs (2010)** montrent que les flavonoïdes ont une activité potentielle vis-à-vis du radical ABTS+. Ceci peut être expliqué par le fait que les flavonoïdes stabilisent les espèces réactives de l'oxygène en réagissant avec le composé réactif du radical.

D'après **Halliwell (1994)**, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre : Le piégeage direct des radicaux libres, l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production des radicaux libres et la protection des systèmes de défense antioxydants (**Halliwell, 1994**). Ce qui montre que les extraits aqueux de *M. officinalis* et de *M. rotundifolia* exercent un grand potentiel comme source d'antioxydants naturels.

Les résultats de l'évaluation du potentiel antimicrobien des huiles essentielles et des extraits aqueux de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* ont révélé l'inefficacité des extraits aqueux vis-à-vis de l'ensemble des souches testées alors que les huiles essentielles sont avérées actives contre toutes les souches bactériennes. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits aqueux sont supérieures à 1 mg/ml. L'inactivité des extraits aqueux peut être expliquée par différentes hypothèses dont ; la non diffusion des extraits dans le milieu de culture, la réactivité de composants des extraits avec ceux du milieu de culture, l'absence de molécules actives dans les extraits testés. Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants contiennent les composés phénoliques et les saponines (**Zhou et al., 2007 ; Thitilertdecha et al., 2008 ; Oke et al., 2009**). Donc cette dernière hypothèse est controversée. Peut être qu'il faudrait fractionner ces extraits puisqu'il y aurait des composés inhibiteurs masquant les composés actifs (**Sreenivasa Rao et al., 1988 ; Arun Kumar and Rengasamy, 2001**).

Les résultats des deux huiles essentielles testées ont montré de bonnes activités contre toutes les souches bactériennes. *Staphylococcus aureus* est la plus sensible, cependant, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont les plus résistantes aux huiles testées. Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif exercent la plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles (**Burt, 2004 ; Holley and Patel, 2005 ; Bakkali et al., 2008 ; Russel, 1991 ; De Souza et al., 2005 ; Nedorostova, 2009**).

La différence de la sensibilité des souches aux huiles testées pourraient être dûes à la variation du taux de pénétration des échantillons à travers la paroi et la membrane cellulaire des structures (**Cox et al., 2000; Cox et al., 2001**). Les bactéries à gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériennes, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50 KD (**Hogan And Kolter, 2003**).

Les résultats montrent que les huiles essentielles testées dans cette étude possèdent un effet antibactérien. Ces résultats peuvent être liés à la composition chimique des huiles étudiées. En effet, **Mazura (1994)** et **Amvam (1998)** ont attribués l'activité antibactérienne à l'Hydrate de sabinène, Terpinène et Sabinène. **Dorman et Deans (2000)** ont testé un grand nombre de

composés purs sur 25 genres de bactéries et ils ont démontré que le terpinéol possède un large spectre d'activité antibactérienne. Ainsi, Les alcools ont un large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes et les aldéhydes sont également bactéricides. Des études ont suggéré que l'espèce de *Nepeta* possède une activité antibactérienne plus prononcée qui est peut être liée à la présence du Caryophyllène.

D'autre part, nous avons constaté que la menthe présente un effet antibactérien qui peut être attribuée à la présence de l'hydrate de Sabinène, le Terpinénol, et le Sabinène. Et à la présence de Caryophyllène, les alcools et les aldéhydes dans l'huile essentielle de *M. officinalis*. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (**Zomorodian et al., 2012; Kalemba et Kunicka, 2003 ; Dorman et Deans, 2000**). En plus des principaux composants, des éléments mineurs peuvent apporter une contribution significative à l'activité antimicrobienne des huiles (**Lahlou, 2004**). Il serait légitime de déduire, d'après nos résultats, que l'activité antimicrobienne des huiles testés résulte de la synergie de leurs composants.

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al., 2002**)

Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont négligeables. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Étant donnée la complexité de leur composition chimique, ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles a son propre mécanisme d'action, d'une manière générale, leur action se déroule en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie

Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes (**Sikkema et al., 1995**). Nos huiles étudiées pourraient devenir un agent antimicrobien naturel et possède un potentiel dans le domaine des industries alimentaires et pharmaceutiques.

A l'issue de ce travail, il ressort que notre objectif était abouti. Les extraits aqueux et les huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* sont doués d'une activité antalgique, anti-inflammatoire et antioxydante. Ce qui confirme l'usage de ces deux plantes en médecine traditionnelle. De plus les huiles essentielles de ces deux plantes possèdent un effet antibactérien *in vitro* et exercent un effet sédatif sur le système nerveux central grâce à une batterie de tests comportementaux utilisés en psychopharmacologie. Loin d'étudier le mécanisme d'action, la plante constitue un ensemble riche en substances actives. Les résultats obtenus peuvent être attribués à un des composés ou à une conjugaison de substances, aux composés phénoliques, aux saponines, ou à une autre famille de composés présente dans l'huile essentielle.

CONCLUSION
ET PERSPECTIVES



Conclusion et Perspectives

Les résultats de nos recherches bibliographiques et de nos études expérimentales nous ont permis de mieux connaître *Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*:

Les extraits aqueux et les huiles essentielles ont été préparés et analysés pour identifier la composition chimique des deux plantes étudiées. Les différentes activités pharmacologiques ; psychotrope, antalgique, anti-inflammatoire, antioxydante et antibactérienne des extraits de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* ont été examinées, permettant de justifier et de confirmer les indications thérapeutiques traditionnelles à base de ces deux plantes. Nous avons également confirmé l'innocuité des extraits aqueux et des huiles essentielles aux doses thérapeutiques. Les préparations aqueuses traditionnelles peuvent être proposées en thérapeutique comme antalgique et anti-inflammatoire comme l'acide acétylsalicylique et antioxydante. L'huile essentielle constituerait une source avantageuse de médicament traditionnelle sédatif et antibactérienne très accessible et reviendrait moins cher aux populations.

La multitude des effets pharmacologiques établie au cours de ce travail, ainsi que la maîtrise de la toxicité de la plante et l'identification phytochimique ouvrent des portes pour une utilisation thérapeutique rationnelle voir industrielle, et constitue une base pour d'autres études visant à investiguer les mécanismes d'action ainsi que la synergie en toxicité qu'en pharmacologie.

Ce travail ne s'arrêtera pas dans ce stade, car il reste d'autres activités biologiques à tester comme l'activité hypoglycémiant de l'huile essentielle de *Melissa officinalis*. Aussi, vu la richesse de ces deux plantes en métabolites secondaire, nous envisageons l'extraction et la caractérisation de ces groupe phytochimique important.

Ainsi, le travail doit s'orienter vers l'étude des principes actifs de la plante sur toutes les activités déjà étudiées et celle que nous n'avons pas encore testé.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références Bibliographiques

Abderrazak M. et Joël R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.

Aboufatima R., Chait A., Dalal A., Zyad A., De Beaurepaire R., (2002). Antinociceptive effects of single and repeated intracerebroventricular and intraperitoneally injections of CT evaluated by tail flick test in rats and writhing test in mice. *Reviews in biology and biotechnology*, 2:38-43.

Adams, R.P. (2001). "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy." Allured Publishing Corp., Carol Stream (III, USA.)

Aghwan, S.S. (1999). Effect of crude water extract of *Cyperus rotundus* on experimental infection of mice with hydatid cysts. MSc Thesis, Baghdad University, Baghdad, (In Arabic).

Al-aboody AKJ. (2001): «Inhibition of *Echinococcus granulosus* protoscoleces with extracts of some medical plants»; MSc Thesis; Baghdad University; Baghdad.

Alaoui K, Lagorge JF, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H and Roquebert J, (1998). Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*. *Annales pharmaceutiques françaises* 56: 220-228.

Al-Eryani May, (2002): «Comparative study on the efficiency on Ivermectin drug and *Peganum harmala* seed extract on protoscoleces hydatid cysts»; MSc Thesis, ALMustansiriyah University; Baghdad.

Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S. (2004). Afferent pathways: a neuroanatomical review. *Brain research*, 1000, 40-56.

Al-Saimary IE, Zeki A, (1999): «In vitro chemotherapeutic effects of antibiotics and plant extract on protoscoleces viability of human hydatid cysts»; *Journal of Basrah Research*; Vol 20; pp: 79-88.

Amarti, F. (2009). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(1), 141-148

Amvam Zollo P.H., L. Byti, F.T. Choumboungang, C.Menute, G. Lamrti, P. Bouchet, (1998). *Flavour Fragrance J.* 13 ; 107.

Antonius, G.F., Kochhar, T.S., Jarret, R.L., Syder, J.C. (2006). Antioxidants in hot pepper: variation among accesions. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*(41);1237-1243

Aqil F., Owais M. (2006). In: *Modern Phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs.* Wiley-VCH. Verlag Germany, pp 59-79.

Arun Kumar K. and Rengasamy R. (2001). Antibacterial activity of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Bit Mar* 43, 417-421.

Auvray N., Caston J., Reber A. and Stelz T. (1989). Role of the cerebellum in the ontogenesis of the equilibrium behavior in the young rat: a behavioral study. *Brain Research, Elsevier.* 505, 291-301 291.

Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, M. (2011). Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and evaluation of their antioxidative effect. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 79-88.

Babulka, P. (2005). La mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Phytothérapie* 3, 114-117.

Bahtiyarca B.R., Cosge B., (2006). The Essential Oil of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Its Components and Using Fields, *J. of Fac. of Agric., OMU,* 21(1), 116-121.

Bailey C.J., (2000). *Trends Pharmacological Sciences;* 21: 259-265.

Bakkali, F., Averbeck, K. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils, *Food and Chemical Toxicology.* 46; 446-475.

Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (2000). "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil." *Food Research International,* 33: 785-791.

Bansod, S., and Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J. Med. Sci.,* 3 (2): 81-88.

Bayes O.M. (1997). Contribution à l'étude de l'activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de *Balanites aegyptiaca* L. (*Zygophyllaceae*). Thèse pharmacie, Bamako. 67 p.

Beaulieu P. (2006). *Pharmacologie de la douleur.* Les Presses de l'Université, Montréal. 608.

Bekhechi, C., F. Atik-Bekkara et D. E. Abdelouahid. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie* 6 : 153-159.

Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H. & Ehilé E.E., (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) (Caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat.* 4: 217-225.

Bellakhdar J., (1984). 1er colloque international sur les plantes aromatiques et médicinales (Rabat) (Actes). Editions maghrébines, Casablanca.

Benayad N., (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Rapport d'activité. Faculté des sciences-Rabat, Maroc.

Bendahou M., Nenyouchef M., Benkhada D., Elissa Costa J., (2007). Influence of the processes extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. *Journal of Applied Sciences.* Vol 8 p 1152-1157.

Bensoit J.H. et J.L Misset, (1979): « Antalgiques, in : *Pharmacologie Clinique : bases de la thérapeutique*»; GIROUD J.P., G. MATHE ET G. MEYNIEL (Eds.). Expansion Scientifique Française, Paris ; Vol 2 ; pp : 1049-1091.

Berche P, Gaillard J-L, Simonet M, (1989). *Bactériologie: bactéries des infections humaines.* Médecine-Sciences Flammarion.

Besson J.M. (1990): « Le nocicept»; in *Moniteurs des pharmacies et des laboratoires*; pp : 8- 13.

Bhourri Wissem, Safa Derbel, Ines Skandrani, Jihed Boubaker, Ines Bouhlel, Mohamed B. Sghaier, Soumaya Kilani, Anne M. Mariotte, Marie G. Dijoux-Franca, Kamel Ghedira and Leila Chekir Ghedira (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia Lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*, 24, 509–515.

Bittar M., Maria de Sousa S., Yunes R., Lento R., Monache F.D., Filho V.C. (2000). Antinociceptive activity of 13, 118- Binarigenin, a biflavonoid present in plants of the Guttiferae. *Planta Medica*, 66, 84-86.

Boissier JR, Simon P, Lwoff JM, (1964). L'utilisation d'une réaction particulière de la souris (Méthode de la planche à trous) pour l'étude des médicaments psycho tropiques. *Thérapie* 22 : 467-468.

Boissier JR, Tardy J, et Diverres JC. (1960). Une nouvelle méthode simple pour explorer l'activité tranquillisante: le test de la cheminée. *Médna exp.* 3, 81

Boizot N., and Charpentier .J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* Pp 79-82.

Bouchet N., Lévesque J., Pousset J-L., (2000). HPLC isolation, identification and quantification of tannins from *Guiera senegalensis*. *Phytochem. Anal.*, 11, 52-56.

Boukef M.K. (1986). Médecine traditionnelle et pharmacopée : les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne - A.C.C.T, Tunisie, 350 pp.

Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gray K., Horn E, McAnalley S. et McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrion* 4, 7p.

Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., and Lognay G., (2006). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *J. Essent Oil Res.*, 18 (6): 663-665.

Braüchler C., Meimberg H., Heubl G. (2010). Molecular phylogeny of *Menthinae* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) -Taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 55, 501-523.

Brooks J., Tracy I. (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *Journal of Anatomy*, 207, 19-33.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

Buenz EJ. (2006). Developed countries should be the focus for effectively reducing chronic disease. *J. Epidemiol. Community Health*; 60(7): 562-3.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal Food Microbiology*; 94; 223-253.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. (2004). «Anti-inflammatory compounds of plant origin. part II .Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules»; *Planta Medica*; Vol 70; pp: 93-103.

Campan R., Scapini F., (2002). *Ethologie- Approche systématique du comportement.* Ed. De Boeck Université. P.165.

Cantino P.D., Sanders R.W., (1986). Subfamilial classification of Labiatae. *Syst. Bot.* 1, 163–185.

Capron F., (1998). Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. *Revue du praticien* 20, 2273-2276.

Carnat A. P., Carnat A., Fraisse D., Ricoux L. and Lamaison J. L., (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72 (5), 301-305.

Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salttoleranceassays and electronmicroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol 46, p1914-1920.

Caston J., Vasseur F., Stelz T., Chianale C., Delhaye-Bouchaud N., Mariani J., (1995). Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Developmental Brain Research.* 86, 311-316.

Chadefaud M., Emberger L. (1960). *Traité de Botanique systématique, tome II : les végétaux vasculaires, fasc. I et II.* Masson, Paris, 1539 pp. 7.

Chalchat J.C., Gorunovic M.S., Maksimovic Z.A., Petrovic S.D. (2000). Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L from Yugoslavia. *J. Essent. Oil. Res.* 12, 598–600.

Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A. (2005). Study of anti-candidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiology and Immunology.* 20, 106-111.

Chanthaphon, S., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against foodrelated microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science Technology* 30(Suppl.1): 125-131.

- Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761.
- Cisowski, W. (1985).** "Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) Scop." *Herba Polonica*, 31: 13-19.
- Clark, D.L., (1974).** Effects of chronic 2g centrifugation on equilibrium behavior in the rat, *Behav. Biol.*, 12, 509-516.
- Claude JR. (1985).** Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. *Sem. Hop. Paris*.
- Cohen Y. (1997).** Les anti-inflammatoires, in *Abrégé de pharmacologie*. Ed.4 Masson, Paris, 465 p.
- Cohen Y. Jacquot C. (2008).** *Pharmacologie : Abrégés de pharmacie*. 6^{ème} édition, Masson, Paris, 487.
- Colot M. (1972).** *Notions techniques de pharmacologie générale*. Masson.
- Conner D.E. (1993).** Naturally occurring compounds. In P. Davidson & A. L. Branen, *Antimicrobials in foods*. New York, NY: Marcel Dekker, 441–468.
- Courvoisier S., Ducort R., Garhini S., Ghetti V., (1957).** *Psychotropic Drugs*, Edit., Elsevier Amsterdam, 373.
- Cousins M.J. and Power I. (1999).** Acute and postoperative pain. In (P.D. Wall & R. Melzack Ed.). *Textbook of Pain*, 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 447-491.
- Cowan MM (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 564-582.
- Cox SD, Mann CM, Markham JI, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. (2000).** The mode of action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.*; 88: 170-175.
- Cox SD, Mann CM, Markham JI. (2001).** Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 91: 492-497.
- Coyen Y. (1990).** Les médiateurs chimiques de l'inflammation, in *Abrégé de pharmacologie*. Ed.3 Masson, Paris, 333-350.

Crawley. J.N., (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities and specific behavioral tests. *Brain Res* 835 :18-26

Crozier A. , Clifford M. N. , Ashihara H. (2006). *Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Publishing, Oxford UK.

Daniel L., Daniel P., Eduardo D., Davies P., Villa R., and Canigueral S., (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* From Uruguay. *Brazi. Archi. Biol and Technol*, 45: 519-524.

Dastmalchi K., Damien Dorman H.J., Oinonen P.P., Darwis Y., Laakso I. and Hiltunen R., (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract *LWT*, 41, 391 – 400.

De Billerbeck, G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Springer .Phytothérapie* ,5: 249–253.

De Miranda G.F.B., Vilar J.C., Nunes Alves I.A., Cavalcanti S.C.H.,Antoniolli A.R., (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of tabebuia avellendae lor. Ex griseb. Inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*, 1, 6.

De Sousa, A.; Alviano, A.; Blank, A.; Alves, P.; Alviano, C; Gattass, C. (2004). *Melissa officinalis* L essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 677-681.

De Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N. and Filho, J.M.B. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol* 48 (4) ; 1516-8913.

Delille L , (2007). *Les plantes médicinales d’Algérie*. Édition BERTI. Alger,122

Derwich Elh, Benziane Z, Chabir R, Taouil R. (2011). In vitro antibacterial activity and gc/ms analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(3): 89-95.

Dewanto V, Wu X, Adom K K, Liu R H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010 -3014.

Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de doctorat en Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS), Université de Bamako.

Dieng C. (1993). Contribution à l'étude de *Khaya senegalensis* (DESR.) A.JUSS (Meliaceae). Thèse pharmacie, Dakar, 10, 109 P.

Dioscoride, (1959). The Greek Herbal of Dioscorides, R. T. Gunther (ed.), repr., Hafner Publishing Co., Inc., New York, pp. 259, 617.

Diouf A. (1991). Etude des médiateurs et leurs rôles physiopathologiques. Thèse Pharmacie, Dakar ; 44 P.

Dorman HJD and Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 308-316.

Du X.M., Sun N.Y., Takizawa N., Guo Y.T., Shoyama, Y. (2002). Sedative and anticonvulsant activities of goodyerin, a flavonol glycoside from *Goodyera schlechtendaliana*. *Phytotherapy Research*, 3, 261-3.

Duarte I.D., Nakamura M., Ferreira S.H. (1988). Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21, 341-3.

Dugan G.M., Gumbmann M.R., Friedman M., (1989). Toxicological evaluation of Jimson weed (*Datura stramonium*) seed. *FD Chem.Toxic.Vol.27, No.8*, pp, 501-510.

Dupon B, Drouhet E. (1987). Antifongiques. *Encycl. Méd. Chir.*, 25013 F10, 14p, Paris.

Dupont C. (1987). Le cout des études toxicologiques d'un nouveau médicament. *Lett. Pharma.*; 1: 1.

Dupont F., Guignard J.L., (2007). Botanique : systématique moléculaire. Edition Masson, 1ère édition, 285 p.

Eberhard T, Robert A, Annelise L. (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.

Echeverrigaray S., Agostini G., Atti Serfi ni L., Paroul N., Pauletti G.F., Dos Santos A.C. (2001). Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4220–4223.

Eycyclopaeddia Britanica, 6. (1965). Eycyclopaeddia Inc. Chicago, III, 564.

Effendi L., Yajun Y. et al., (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylatedflavonols in Escherichia coli .Metab.Eng.8: 172-181.

EL Rhaffari Lhoussaine, (2008). Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Maroc, “Empowering the Rural Poor by Strengthening their Identity, Income Opportunities and Nutritional Security Through the Improved Use and Marketing of Neglected and Underutilized Species”

Elliott, A.M., Smith, B.H., Hannaford, P.C., Smith, W.C., Chambers, W. (2002). « The cours of chronic pain in the community: results of a 4-year follow-up study pain»; Vol 99; pp: 299-307.

Emily M. (2007). Encyclopaedia of Earth, Washington, DC.

Encyclopedie pour tous, (1970). Editors: Brunke EJ.Publisher: De Gruyter, Berlin, Fed.Rep. Ger. Edition Lipidis. Paris. 49-55.

Famaey J.P. (1983). Biochimie de l'inflammation. In (F. Blotman, A. Crastes de Paulet & L. Simon Ed.). Acide arachidonique et ses dérivés. Paris, Masson, p. 174-188.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique 108-250.

Fennane M. (1987). Grande encyclopédie du Maroc: Flore et végétation. Ed. Grupp. Walk. Over Italie, G.E.M. Rabat, 114-116.

Fialová S., Tekel'ová D., Mrlianová M., Grančai D., (2008). The Determination of Phenolics Compounds and Antioxidant Activity of Mints and Balms Cultivated in Slovakia, Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 55, 96-102.

Finar L. (1956). Organic chemistry: Stereochemistry and the chemistry of Natural Products. Edition low-priced. p. 718.

Firn RD. (2004). Natural products- A simple model to explain chemical diversity. Natural Prod. Rep.; 20: 382-391.

Forte S., Laenen E., Nason P., Rojo J., (2010). Heavy quarks in deep-inelastic scattering. Nuclear Physics B. 834, 116–162

- Garnier Delamare (1992).** Dictionnaire des termes de médecine. Editions Maloine, Paris.
- Ghedira K (2005).** Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Giordani R. Kaloustian J, (2006).** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques *J Phytotherapie* (2006) Numéro 3,121-124
- González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation *Br J Nutr*3:S15-27.
- Guignard J. L. (2000).** Biochimie végétale. 2^{ème} édition. Edition Dunod, Paris, pp 198-207.
- Guirmand F. et Le Bars D. (1996).** Physiologie de la nociception. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 15, 1048-79.
- Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Poiissiou M., Adiguzel A., et Ozkan H., (2007).** Antimicrobial and antioxidant properties the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456. gy, 29, 130-135.
- Guy G, (1997).** Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse. Édition L'Harmattan paris
- Hale AL. (2003).** Screening Potato Genotypes for antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis, Office of Graduate Studies of Texas A&M University, Genetics 260p.
- Halliwell B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* 52, 253-265.
- Hart and Shears (1997).** Atlas de Poche Microbiologie. Médecine. Sciences, Flammarion, Paris 313 p.
- Hegnauer R., (1973).** Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 6, 761pp.
- Herodez S. S., Hadolinb M., Skergeta M. and Zeljko Knez, (2003).** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis L.*) leaves, *Food Chemistry*, 80, 275–282.

- Hmamouchi M., (2001).** « Les plantes médicinales et aromatiques marocaines », 2ème édition.
- Hmamouchi M., (2005).** Stratégie de conservation, de valorisation et de développement des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Congrès International sur les Plantes Médicinales 16-19 Mars. Errachidia. p. 9.
- Hmamouchi M., (1999).** Les Plantes médicinales et aromatiques Marocaines : Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie-Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), 389 pp.
- Hogan, D. And Kolter, L. (2003).** Why are bacteria refractory to antimicrobials? Current Opinion in Microbiology. 5; 472-477.
- Holley, R. A. and Patel, D., (2005).** Improvement in shelf-life and safety of perishable compounds from leaf essential oil and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22 ; 273-292.
- Hostettmann K, 1997.** Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments. Ed. Favre SA, Lausanne.
- Huang Guangrong., Jiang Jiaxin.,and Dai Dehui. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. African Journal of Biotechnol.7 (9): 1335-1338.
- Huang, M.H., Huang, S.S., Wang, B.S., Sheu, M.J., Hou, W.C. (2011).** Antioxidant and antiinflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. J. Ethnopharmacol., 133: 743 - 750.
- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A.M., Cavrini V. (2002).** GC/ MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. J. Pharm. Biomed. Anal. 29, 691–700.
- Ibn Tattou M., Fennane M. (1989).** Aperçu historique et état actuel des connaissances sur la flore vasculaire du Maroc. Bull. Inst. Sci. 13, 85–94. 30
- Igor Passi L.B.; (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo* des Lamiacées. Thèse pharmacie pour obtenir le grade de Doctorat en pharmacie (Diplôme d'Etat), Bamako-Mali.
- Ikegami, F., Sumio, M., Fujii, Y. et al., (2006).** Pharmacology and toxicology of *Bupleurum* root-containing Kampo medicines in clinical use, Hum. Exp. Toxicol., 25, 481-494.

Insel P.A., (1990). Analgesic antipyretic and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatic arthritis and gout. In: Goodman, A.G., Gilman, A.G. Eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics vol. 8. Pergamon Press, Oxford, pp. 637–681.

Iserin P., Masson M., et Restellini J.P., (2007). Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14.

Iserin P., Masson M., Restellini J.P., (1997). « Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soin », Larousse-Bordas.

Iserin P., (2001). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10, 335.

Jacob pellecuer, Tomei J, (1979). Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique, Ri vista italiana. Vol 11, p 125-134.

Judd Walter S, Campbell Christopher S, Kellogg Elizabeth A, Stevens Peter, (2002). Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université ,84-87 ,396-399.

Juhas S., Bukovska A., Cikos S., (2009). Anti-inflammatory effects of Rosmarinus officinalis essential oil in Mice. Acta. vet 78: 121–127.

Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S., (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: Forsch Komplementmed.16: 79–90.

Juven B.J., Schved F., Weisslowiez H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol. 76: 626-631.

Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 10, 813-829.

Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.-F., (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Phytothérapie, 6: 160–164.

Kansole M.M.R., (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkinafaso : cas de *Leucas Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *HOSLUNDIA OPPOSITA* Vahl ET *ORTHOSIPHON PALLIDUS* Royle ex Benth. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Ouagadougou.

Karlsen Anette, Retterstøl Lars, Laake Petter, Paur Ingvild, Kjølrsrud-Bøhn Siv, Sandvik Leiv, and Blomhoff Rune. (2007). Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor-kB Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults 1–3. *J.Nutr.* 137:1951-4.

Kayaalp, S.O., (1998). « Medical Pharmacology, in terms of rational treatment (Rasyonel tedavi yonunden tibbi pharmacology) »; Ankara: Ha-cettepe- Tas Ltd. Sti.

Kelly E.H., Anthony R.T. and Dennis J.B., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.

Kernbaum S., (1980). *Eléments de pathologie infectieuse*. Edition Specia, France, 567 p.

Khanbabae K. and Ree T.R., (2001). Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18: 641-649.

Khiati M. (1998). *Guide des maladies infectieuses et parasitaires*. OPU, Alger.

Kidd B.L. & Urban L.A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87, (1), 3-11.

Kim H.Y., Moon B.H., Lee H.J., Choi D.H. (2004). Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 227–230.

King A., and Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jof the American dietetic association*. 99:213-218. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008

Kondjoyan, N. et Bergdague, J.-L. (1996). "A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds." *Laboratoire Flaveur, INRA, Clermont-Ferrand*.

Krall RL, Penny JK, White BG. Kupferberg HJ, Swinyard EA., (1978). Antiepileptic drug development 2, anticonvulsant drug screening. *Epilepsia*; 19, 409-28.

Kubeczka, K.H., Bartsch, A. et Ullmann, I. (1982). "Recent studies on essential oils of *Apiaceae*." *Aetherische Oele, Ergeb. Int. Arbeitstag.*: 158-187.

Kulišić T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006). Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*. 44, 485-492.

- Lahlou, M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18, 435-448.
- Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. et Hseini S., (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental), *Lejeunia*, N° 186.
- Lalonde R., Filali M., Bensoula A.N., and Lestienne F., (1996).** Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol Learn Mem* 65; 113-120.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.-P. (1994).** Biogenèse des monoterpènes. IIIa chaîne isoprénique *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 133, 79 – 99.
- Lamnaouer D., (2005).** Interaction entre plantes médicinales et médicaments : Cas de *Ferula communis* L : une plante anticoagulante. Congrès International sur les Plantes Médicinales 16-19 Mars. Errachidia. p. 22.
- Landry,P, Gervais, M et O'connor, KP., (2008).** Mise à jour sur les considérations pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et les ontérations médicamenteuses dans le choix d'une benzodiazépine. *Annales médico-Psychologiques, revue psychiatrique.* Vol, 166, pp, 585-594.
- Lautrette S., (2004).** Utilisation des fibres de carbone activé comme catalyseurs de O- et N-glycosylation : Application à la synthèse d'analogues de saponines et de nucléosides. Thèse de doctorat en Chimie appliquée. Limoges.
- Lawrence B.M., Hogg M., Terhune S., (1972).** *J. Flavour Industry*, 37, 467.
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W., (2001).** Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53, 597-652.
- Le Marec N., Caston J., and Lalonde R., (1997).** Impaired motor skills on static and mobile beams in Lurcher mutant mice. *Exp Brain Res* 116: 131-138.
- Le Vante A., Albe-Fessard D. et Tuurel C.I., (1978):** «Donnés récentes sur les voies de la douleur »; *Ann, Anes, Fran* ; XIX ; pp : 302-308.
- Lechat P.; Calvo F.; De Crémoux P.; Giroud J-P.; Lagier G.; Lechat Ph.; Rouveix B.; Weber S. (1990).** Les médicaments de l'inflammation, in *Abrégé de pharmacologie.* Masson, Paris, 288-319.
- Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M., (1995).** *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien.* Doin Editeurs, Paris.

- Leminor L., et Veron M., (1998).** Bactériologie médiale. Flamm. Méd. Sci. 273-294.
- Lister E, Wilson P., (2001).** Measurement of total phenolics and ABTS assay for Antioxidant Activity. New Zealand: Crop Research Institute.
- Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Canigueral S. (2002).** Essential Oils of Mentha pulegium and Mentha rotundifolia from Uruguay. Bras. Arch. Boil. Technol. 45 (4), p. 519–524.
- Loza-Tavera Herminia (1999).** Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties. Adv. Exp. Med. Biol. 464, 49-62.
- Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. J. Acta. biologica. szegediensis. 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005)
- Lullmann H., Mohr K., Ziegler A. (1991).** Atlas de Poche de Pharmacologie (2^{ème} édition). Flammarion. Paris. p : 32.
- Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** Botanique 3^{ème} Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.
- Lyu S.Y., Park W.B. (2005).** Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. Archives of Pharmaceutical Research, 5, 537-81.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. et Salunkhe, D.K. (1995).** "Toxicological aspects of food antioxidants." Food antioxidants. Technological and Health perspectives.
- Mann CM, Cox SD et Markham JL. (2000).** The outer membrane of Pseudomonas aeruginosa NCTC 6749 contributes to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), Letters in appl. Microbiol 30, 294-297.
- Maria Izabel G S, Manuel Rufino A N, Paulo Florentino, Brinell AM, Jeferson Falcão A, Damião PS, Silvânia Maria MV, Francisca Cléa FS. (2007).** Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 88: 141–147.
- Marongiu B. , Porcedda S., Piras A., Rosa A., Deiana M. and A. Dessi, (2004).** Antioxidant Activity of Supercritical Extract of Melissa officinalis Subsp. Inodora, Phytoter. Res., 18; 789 – 792.

Marzouk Zohra, Ehsen Haloui, Nadia Fenina, Abderrahman Bouraoui, Mahjoub Aouni: 2010. «Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from Southern Tunisia»; Journal of Ethnopharmacology; Vol 128(1, 2); pp: 15-19.

Matasyoh J.C., Maiyo Z.C., Ngure R.M., Chepkorir R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. Food Chemistry 113, 526–529

Mazura G., Farai C., Lameck H.L., Mavi S., (1994). Flavour Fragrance J. 9; 299.

McGaw L.J.; Anna K.J. and Van Staden J. (1997). Prostaglandin synthesis inhibitory in Zulu, Xhosa and Sotho medicinal plants. Phytother. Res. 11, 113-117.

Melzack R. (1997). L'aspect multidimensionnel de la douleur. In (L.Brasseur, M. Chauvin & G. Guilbaud). Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques. Paris, Maloine, p. 1-3.

Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., (2004). Inflammation et douleur : thérapie génique expérimentale. Médecine/Sciences, 20 :325-30.

Meyer R.A., Campbell J.N. & Raja S.N. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. Edinburgh, Churchill-Livingstone.

Meyre-Silva C., Yunes R., Santos A.R.S., Magro J.D., Monache F.D., Filho V.C. (1999). Isolation of a C-Glycoside Flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* Leaves. Planta Medica, 65, 263- 294.

Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. et Rice-Evans, C. (1996) "The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators." FEBS Letters, 392: 40-44.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. et Milner, A.A. (1993) "Novel methods for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." Clin.Sci, 84: 407-412.

Miossec P. (2003). Physiopathologie de l'inflammation. La revue du praticien, 53, 1-7.

Mitsher LA., Lev RP., Bathala MS., Wu WN., Beal J.L., (1972). Antibacterial agents from higher plants, Introduction rationale and methodology. Journal of Natural Products 35, 157-165.

- Moghtader M., Afzali D., (2009).** Study of the antibacterial properties of the essential oil of Rosemary. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*; 5(3): 393-397.
- Morel Y., et Barouki R., (1999).** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal* 342(3), 481-496.
- Moulin M. (1998).** Médicaments antiinflammatoires, in :Abrégé de pharmacologie . Masson, Paris, 332-336.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001).** "Natural antioxydants from residual sources." *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Nagell A., Hefendehl FW. (1974).** Composition of the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Planta Med.* 26, p. 1–8.
- Namiki M. (1990).** Antioxidants antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci.* 29: 273-300.
- Nantz. Meri P, Rowe .Cheryl A., Carmelo Nieves Jr., and Percival Susan S., (2006).** Immunity and Antioxidant Capacity in Humans Is Enhanced by Consumption of a Dried, Encapsulated Fruit and Vegetable Juice Concentrate *J Nutr* 136:2606-10.
- Nauciel. C., and Vildé J.L. (2005).** *Bactériologie médicale*, 2^{ème} Ed. Masson. Paris. pp: 5-10.
- Nedorostova, L. Kloucek, P., Stolcova, L. And Pulkrabek, J. (2009).** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria, *Food Control.* 20 (2); 157-160.
- Niyah Njike G., Watcho P., Nguenefack T.B., Kamayni A., (2005).** Hypoglycaemic activity of the leaves of *Bersama engleriana* n rats. *Afr J Trad.*, 2(3): 215-221.
- OECD. Test Guidelines: (1998), pp. 408.**
- OECD/OCDE (2002).** guidelines for the testing of chemicals, revised draft guidelines 423; acute oral toxicity-acute toxic class method, revised document.
- Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., (2009).** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry* 112, 874–879
- OMS., (2002).** Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2005-2005. Genève WHO/EDM/TRM.
- Oyaizu M (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.

Panda B .B., Kalpesh Gaur, M.L., Kori, L.K. Nema, C.S. Sharma and A.K. Jain, (2009): « Anti-inflammatory and analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models»; *Global Journal of Pharmacology*; Vol 3 (1): pp: 01-05.

Paris R. and Moyse H. (1965). Précis de matière médicale. Ed. Masson et Cie, Paris, 416p.

Pathak D., Pathak K., Sigla A.K. (1991). Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia*, 62, 371-388.

Patrick B., Jean L., and Michel S. (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.

Piva G., Morlacchini M., Pietri A. Fusari, A., Corradi, A., Piva., A. (1997). Toxicity of dietary scopolamine and hyoscyamine in pigs. *Livestock Production Science* 51(1997) 29-39.

Pokorny J (2001). Antioxydants in food: practical applications, Introduction. In Pokorny J, Yanishlieva Y, Gordon M.H eds, pp.1-3.

Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current organic chemistry* 1, 415-417.

Pratt, D.E. (1980). "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds." Ed. M.G. Simic, and M. Karel, Plenum, Autoxidation in food and biological systems: 261-282.

Price D.D. (2002). Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. *Molecular interventions*, 2, 392-403.

Privat A, (1980): «Substance P et analgésie, in : *Quovadis*»; MUY ARD J.P. et R. RONCUCCI (Eds.). Clin Midy, Montpellier ; pp : 147-159.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams, S.M. (2000). Neuroscience (seconde édition). Sinaute Associates. Inc. Sunderland, Massachusettes. USA.

Queiroz A C, Daysianne Periera de Lira, Thays de Lima Matos Freire Dias, Everton Tenorio de Souza, Crolina Barbosa Brito DA Matta, (2010). «The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae)»; *Journal of Ethnopharmacology*; Vol 128; pp: 377-383.

Quezel P., Medail F. (1994). La région circum-méditerranéenne. Centre mondial majeur de biodiversité végétale. Actes 6èmes Rencontres de l’A.R.P.E. : 152-161. Gap. France.

- Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique. T. II, Paris, 781- 801.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. et Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237
- Revillard H. (2001).** «Immunologie»; De Boeck Université 4ème Edition; p : 600.
- Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G. and Esquivel M.M., (2001).** *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*, 21 51 – 60.
- Richard C et Kiredjian M., (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucelle*, *Bordetella*. 2ème édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. pp: 42-43.
- Riesterer L., et Jaques R., (1970).** «The influence of anti-inflammatory drugs on the development of an experimental traumatic paw oedema in the rat»; *Pharmacology*; Vol 3; pp: 243-251.
- Robinson T., (1991).** The organic constituents of higher plants. The chemistry and interrelationships. Cordus Press, MA, USA.
- Roll R., Hôfer-Bosse TH. and Kayser D. (1986).** «New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals t»; *Toxicol. Lett; Suppl.* 31; p: 86.
- Ronchetti F. & Russo G., (1971).** A new alkaloid from *Rauvolfia*. *Phytochem.* 10: 1385-1388.
- Roy-Byrne P. P., (2005).** “The GABA-benzodiazepine receptor complex: structure, function, and role in anxiety,” *Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 66, no. 2, pp. 14–20.
- Rozzi N. L., Phippen W., Simon J. E. and Singh R. K., (2002).** Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil Components from Lemon-Scented Botanicals, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 35, 319 –324.
- Russel, A. D. (1991).** Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 71; 191-201.
- Sadraei H., Ghannadi A. and Malekshahi K., (2003).** Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions, *Fitoterapia*, 74 (5), 445-452.

- Saenz M.T., Garcia M.D., Fernandez M.A., (1998):** «Anti inflammatory activity and acute toxicity of *Anredera leptostachys*»; *Phytomedicine*; Vol 5 (3); pp: 195-198.
- Sanchez-Moreno C., (2002).** Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International* 8: 121-137.
- Santangelo Carmela, Vari Rosaria, Scazzocchio Beatrice, Di Benedetto Roberta, Filesi Carmela and Masella Roberta. (2007).** Polyphenols, intracellular signaling and inflammation *Ann Ist Super Sanit* 43: 394-405.
- Schauenberg P., Paris F. (1977).** Guide to medicinal plants. Guildford, Lutterworth Press. 349p.
- Schorderet Michel, Dayer J-M. et coll. (1998).** Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation; Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (in *Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*). Slatkine, Paris-Génève, 569-606.
- Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K., (2006).** Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67: 2058–2070.
- Sikkema J.A., de Bont et Poolman B., (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Journal of Applied Microbiology*. Wiley Online Library. p 63-69.
- Sreenivasa Rao P.P. Sreenivasa R.P. Karmarkar S.M. (1988).** Antibacterial activity of species of *Sargassum*. *Botanica Marina* 31, 295-298.
- Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004).** *Microbiology of Waterborne Diseases*. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002).** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother*. 56: 200-207.(cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Taskova R., Mitova M., Evstatieva L., Ancev M., Peev D., Handjieva N., Bankova V., Popov S. (1997).** Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae and Rubiaceae. *Bocconea*. 5, 631-636.
- Telesphore B. Nguelefack, Rafael C. Dutra, Ana F. Paszcuk, Edineial L. Andrade. (2010).** «Antinociceptive activities of the methanol extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera*

L.Var sativa in mice are dependent of NO-cGMPATP- sensitive-k+ channel activation»; Journal of ethnopharmacology ; Vol 128 ; pp : 567-574.

Thiébaud, G. (2010). Phytothérapie dans les sports et courses hippiques: Du sens et du non sens de l'usage de préparations phytothérapeutiques. *Ars Medici schweizer Zeitschrift für Allgemeinmedizin* 100, 36.

Thitilertdecha N., Teerawutgulrag A., Rakariyatham N. (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT - Food Science and Technology* 41, 2029-2035.

Tihel GH, Wagnerand H, Bos R. (1982). Chemical composition of the essential oil from *Melissa*. *Planta Med*; 46(2): 91-98.

Toth J., Mrlinova M., Tekelova D. and Korenova M., (2003). Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 50, 139-146.

Touitou Yvan, (1993). Pharmacologie Diplôme d'Etat d'Infirmier (e), 7eme édition Paris. 407 p.

Traoré Fanta (1999). Evaluation de l'activité antimalarique de *Glinus oppositifolius* (L.). *A.D.C., Nauclea latifolia* (SM.), *Mitragyna inermis* (WILLD.) O. KUNTZE, trois plantes utilisées en médecine traditionnelle au Mali. Thèse de doctorat, Marseille II, 199 P.

Ueno A., Matsumoto H., Naraba H., Ikeda Y., Ushikubi F., Matsuoka T., Narumiya S., Sugimoto Y., Ichikawa A., Oh-ishi S. (2001). Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochemistry and Pharmacology*, 62:157-60.

Valant-Vetschera K.M., Roitman J.N., Wollenweber E. (2003). Chemodiversity of exudates flavonoids in some members of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31, 1279-1289.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.

Valnet J., Durraffourd C.H., Durraffourd P., Cilapraz J., (1978). L'aromatogramme; Nouveau résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant. Med. Phytothe*. 12 :43-52.

- Van Arman, C.G., (1974).** Anti-inflammatory drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 16, 900–904.
- Vaverkova S, Mistrikova I, Farkas P. (2012).** Qualitative properties of *Melissa officinalis* after the application of Rastim 30 DKV. *Botanica Serbica*; 36(2): 81-84.
- Venskutonis PR. (1996).** A chemotype of *Mentha longifolia* L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *J Essent. Oil Res.* 8, p. 91-95.
- Wagner H. & Bladt S., (2001).** *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas* (2nd ed.). Springer, Berlin, pp. 349-364.
- Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. (2003).** Antibacterial activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria. *J. Appl. Microbiol*; 94: 240-247.
- Wang J., And Mazza G., (2002).** Effects of anthocyanins and other Phenolic compounds on the Production of Tumor Necrosis factor α in LPS/IF N- γ Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4183.
- Wang LM, Mineshita S. (1996).** Preventive effects of Unsei-in and Oren-gedoku-to, Chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J Pharm Pharmacol*; 48: 327-331.
- Wang, L.X., Wang, Z.J. (2003).** «Animal and cellular models of chronic pain»; advanced drug Delivery Reviews; Vol 55; pp: 949-965.
- Willis W.D., Wislund K.N. (1997).** Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. *Journal of Clinic Neurophysiology*, 14, 2-31.
- Winter C.A., Risley E.A., Nuss C.W. (1962).** Carrageenan-induced oedema in hind paw of rats-an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of Society Experimental Biology Medicine* 111, 544–547.
- World Health Organization. (2004).** WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. World Health Organization, Geneva.
- Wright S., (1973).** *Physiologie appliqué à la médecine*; Flammarion Médecine-Sciences, 12^{ème} éd. Paris; p : 606.
- Wynn, S. G. and Fougère, B. J. (2007).** *Materia medica*. In: *Veterinary herbal medicine*, ed. Mosby Elsevier, St Louis, pp.459-684.

Yepez B., Espinosa M., López S. and Bolaños G., (2002). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equilibria* 194–197, 879–884.

Yvan T., (1997). *Pharmacologie* 8ème Edit. Masson. Paris-Milan-Barcelone ; 388 p.

Zgórka G., Głowniak K., (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26, 79-87.

Zhou L., Li D., Wang J., Liu Y., Wu J., (2007). Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Natural Product Research* 21, 283-291.

RÉSUMÉ



Résumé

Ces dernières décennies, les plantes médicinales et leur utilisation en thérapie ont vu leur essor se développer de façon notable et ce pour différentes raisons : économiques, sociales, culturelles. Cependant, l'automédication par ces plantes ne reste pas sans risque. Soumettre ces plantes à une étude scientifique rigoureuse est donc primordial pour vérifier leur réputation médicinale et leur innocuité.

Notre thématique de recherche s'articule autour de plusieurs axes. En premier nous sommes intéressés au criblage phytochimique des extraits aqueux et à l'analyse des huiles essentielles par chromatographie gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia*. Ces extraits analysés possèdent une richesse et une diversité dans leur composition chimique. Le deuxième axe a été consacré à l'étude toxicologique ; L'étude de la toxicité aigue des extraits aqueux et des huiles essentielles de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* a permis la détermination de leurs doses létales 50 chez les souris. Celle de la toxicité chronique a pour objectif de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologiques consécutives aux administrations répétées (pendant 90 jours) des extraits.

Enfin, le troisième axe est consacré à la détermination du profil pharmacologique des extraits des deux plantes étudiées. Dans ce cadre, différentes activités ont été étudiées: l'activité sédatrice, anti-inflammatoire et analgésique *in vivo* et l'activité antioxydante et antibactérienne *in vitro*. Les résultats de ce travail ont démontré que les différents extraits testés (aqueux et HE) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et analgésique intéressantes. D'un autre côté, nous avons montré que seulement les huiles essentielles de la mélisse et de la menthe exercent chez l'animal une activité sédatrice. Enfin dans le dernier volet, nous avons montré que les extraits aqueux des deux plantes étudiées possèdent une forte activité antioxydante par rapport aux huiles essentielles qui présente une faible activité. L'activité antibactérienne a été étudiée vis-à-vis de six souches bactériennes. Les HE de la mélisse et de la menthe exercent une activité antibactérienne remarquable. *S. aureus* est la souche la plus sensible avec un diamètre de zone d'inhibition de 46 mm pour la mélisse et de 29 mm pour *M. rotundifolia*.

Les deux espèces *Melissa officinalis* et *Mentha rotundifolia*, par la présence de nombreuses familles chimiques, possèdent des activités biologiques et pharmacologiques intéressante. Aux regards de ces activités, il convient de mener des investigations intenses pour enrichir la production des médicaments à base de plante.

Mots clefs : *Melissa officinalis*, *Mentha rotundifolia*, Huiles essentielles, Extraits aqueux, Composition chimique, Toxicité aigue, Toxicité chronique, Activités pharmacologiques et biologiques, *in Vivo*, *in Vitro*.

Abstract

In recent decades, the use of medicinal plants in therapy has significantly increased for many reasons including economic, social, cultural ones. However, self-medication by these plants is not without risk. Submitting these plants to a rigorous scientific study is therefore essential to check their reputation and safety.

Our theme of research articulates around several axes. The first one was the phytochemical screening of the aqueous extracts and analysis the essential oils by combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of *Melissa officinalis* and *Mentha rotundifolia*. These analyzed extracts showed a richness and diversity in their chemical composition. The second is dedicated to the toxicological study; the study of the acute toxicity of aqueous extracts and essential oils of *Melissa officinalis* and *Mentha rotundifolia* allowed the determination of their 50 lethal doses in mouses. Chronic toxicity aims to highlight the functional alterations and / or consecutive pathological resulting from repeated administration (for 90 days) of extracts.

The third axes concern the pharmacological profile of the extracts of two plants studied. Various activities were studied: sedative, anti-inflammatory and analgesic activity in vivo and antioxidant and antibacterial activity in vitro. The results showed that both extracts (aqueous and EO) have interesting anti-inflammatory and analgesic properties. On the other hand, we have shown that only the essential oils of *M. officinalis* and *M. rotundifolia* exert sedative activity at animal. Finally, we have shown that aqueous extracts of the two plants studied have high antioxidant activity compared with essential oils which has low activity. The antibacterial activity was investigated vis-a-vis of six bacterial strains. The EO of *M. officinalis* and *M. rotundifolia* exert a remarkable antibacterial activity. *S. aureus* is the most sensitive strain with a diameter of 46 mm for *M. officinalis* and a diameter of 29 mm for *M. rotundifolia*.

Both species *Melissa officinalis* and *Mentha rotundifolia*, present a rich source of biological interest due to its chemical diversity. In this focus, more comprehensive investigations are in fold needed to establish more data about this family of interest.

Key words: *Melissa officinalis*, *Mentha rotundifolia*, essential oil, aqueous extract, chemical composition, acute toxicity, chronic toxicity, pharmacological activity, *in Vivo*, *in Vitro*.

ملخص

خلال العقود الأخيرة، شهدت النباتات الطبية واستخدامها في التداوي ارتفاعا ملحوظا و ذلك لعدة أسباب : اقتصادية منها و كذا اجتماعية و ثقافية . ومع ذلك، التطبيب الذاتي بهاته النباتات لا يخلو من مخاطر . لذا، وجب وضع هاته النباتات تحت دراسة علمية صارمة للتحقق من سمعتها الطبية وسلامتها.

موضوعنا للبحث يدور حول عدة محاور. أولا إهتمنا بالفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات المائية لمليسا أوفيسيناليس و منطاغوتونديفوليا و تحليل زيوتهم الأساسية أيضا. هاته المستخلصات المحللة أظهرت غنى و تنوعا في تركيبها الكيميائية . و خصص المحور الثاني لدراسة السمية : سمحت دراسة التسمم الحادّ لكل من المستخلصات المائية و الزيوت الأساسية لمليسا أوفيسيناليس و منطاغوتونديفوليا بتحديد الجرعة القاتلة لخمسون بالمئة من الفئران . فيما يتعلق بدراسة السمية المزمنة فقد مكنتنا من ملاحظة تدهورات في فعالية بعض الأعضاء راجعة للجرعات المتكررة من المستخلصات (مدة 90 يوما).

ختاماً، خصص المحور الثالث من الدراسة لتحديد البيانات الدوائية لمستخلصات النبتتين المدروستين . في هذا الإطار، عدة أنشطة تمت دراستها : النشاط المهدئ مضاد الإلتهاب و المسكن على الفئران. و نشاطها ضد التأكسد و المقاوم للبكتيريا في المختبر. و قد أظهرت النتائج أن مختلف المستخلصات (مائية و زيوت أساسية) تتميز بخصائصها مضادة للإلتهاب و مسكنة للألام بشكل كبير. من جهة أخرى، لقد بينا أن الزيوت الأساسية فقط لكل من النبتتين المدروستين يمتلكان خاصية المهدئ على الحيوان. و في نهاية مطاف الدراسة المخبرية، تبيّن أن المستخلصات المائية لكل من النبتتين لها خاصية عالية ضد التأكسد مقارنة مع الزيوت الأساسية الذي يعتبر ضعيفا . النشاط المضاد للبكتيريا تمت دراسته باستخدام ستة أنواع من البكتيريا . الزيوت الأساسية للنبتتين لديهما نشاطا ملحوظا ضد البكتيريا . و يعتبر ستافيلوكوكس أوريوس البكتيريا الأكثر حساسية ضد الزيوت الأساسية.

كلا من النوعين من النبتتين ميليسا أوفيسيناليس و مينطا غوتونديفوليا، و بسبب إحتوائها على العديد من المركبات الكيميائية، تتميز بأنشطة إحيائية و دوائية مهمة . بالنظر لكل هذه الخصائص، ينبغي القيام باستثمارات مهمة لإغناء إنتاج الأدوية المصنعة انطلاقا من النباتات.

كلمة المفتاح : ميليسا أوفيسيناليس، مينطا روتونديفوليا، زيوت أساسية، مستخلصات مائية، مركب كيم يائي، مسية حادة، سمية مزمنة، أنشطة دوائية و إحيائية