

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement et de la recherche scientifique

Université Djilali Bounaama Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie

Mémoire de Fin d'Etudes

Pour l'obtention de diplôme

Master

En

« Génie des procédés »

Option :

« Génie pharmaceutique »

Thème :

**Etude de l'activité antibactérienne et antioxydante de
l'huile essentielle de *Petroselinum Sativum* de la région
d'Ain Defla**

Réaliser par : Laama Hadjer

Soutenu le : 24 / 06 / 2015

Devant le jury :

Présidente : M^{me} Mesli chahrazad

Encadreur : M^{me} Boussaha Mahdia

Examineur : Mr Boudchiche

Année Universitaire 2014/2015



Remerciements

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à mon "Dieu ALLAH le Tout Puissant " de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

اللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك .

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de cette thèse.

Un remerciement exceptionnel à mes parents et à toute ma famille pour leurs soutiens, leurs présences et leurs encouragements.

*Je tiens à remercier ma promotrice M^{me} **BOUSAHA MAHDIA** qui n'a pas hésité à m'encadrer et d'avoir m'aide par son savoir et ses conseils.*

Qu'ALLAH la protège, et en lui souhaitant, la prospérité, et la bonne santé durant toute sa vie.


*Je tiens à remercier aussi **la présidente de jury**, qui a bien voulu participer à ce jury.*

*Je remercie aussi **l'examineur** pour leur collaboration, et d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Je remercie spécialement mon marie **BOULAL MOHAMMED** qui ma aidé beaucoup.*

Aujourd'hui, j'ai envie de te dire un énorme "merci", pour tout ce que tu me donnes merci pour ta présence à mes côtés, pour ton soutien, pour tes conseils, pour l'attention que tu me portes, pour ta grande gentillesse, pour ta générosité... (La liste pourrait faire des pages et des pages !).

*Un remerciement exceptionnel pour M^{elle} **Mebrek Fatiha**, et un grand merci pour l'équipe de laboratoire d'analyse médicale de Meribai Riad et à tous les amis sans exception.*



Je dédie ce travail :

*A mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude
Pour leur soutien tout le long de mes études*

*A mon **Marie Médo**, mes **Beaux Parent**, mes belles sœurs
Imane et **Nodjoud** et mon beau frère **Ilyasou***

*A mon frère **Yazid** et ma **Soeur Nesrine** "ma petite **nina**" qui
m'a assisté durant la dactylographie de cette thèse.*

*A tout mes **Amis***

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

HADJER

ملخص

من المعروف أن الزيوت الأساسية المستخرجة من النباتات تمتلك الخصائص الدوائية سواء من الناحية الإنسانية أو الصناعية..

بالإضافة الى العديد من الخصائص: المضادة للعدوى، مضاد للجراثيم، المضادة للأكسدة، ... الخ الزيوت الأساسية هي مواد نشطة للغاية ويمكن أن تشكل أيضا الاهتمام بالنسبة للبروبيوتيك.

تهدف هذه الدراسة لإستخراج الزيت العطري من بذور *Petroselinum Sativum* عن طريق التقطير بالبخار وإعطاء أفضل مردود من 2.1٪، ودراسة المعلمات التي تؤثر في المردود.

النفط المستخرج تتم عليه التحاليل الفيزيائية و الكيميائية و كذلك تحديد الخصائص الحسية.

تم تحليل التركيب الكيميائي من الزيوت الأساسية من بذور *Petroselinum Sativum* بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية وأظهرت نتائج التحليل أن الزيوت الأساسية المستخرجة تشمل أساسا:

Myristicine (23,71 %), Apiol (20,47 %), α -pinène (19,11 %), β -pinènes (13,98 %), Elemicine (11,62 %), Limonène (4,66%).

بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بثلاثة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض و 3 سلالات الكائنات الحية المجهرية الأخرى.. أظهرت النتائج فعالية متوسطة ضد السلالات المسببة للأمراض ومقاومة ملحوظة من سلالات بروبوتيك تقترح إمكانية استخدامها في مختلف المجالات. (الغذائي و العلاجي)

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة من قبل اثنين من الإختبارات ومحاصرة إختبار DPPH الجذور الحرة و انخفاض الحديد (FRAP). وتظهر النتائج التي تم الحصول عليها نشاط جيد مضاد للأكسدة

كلمات البحث: بذور البقدونس، استخراج، التقطير بالبخار، والزيوت العطرية، مضاد للجراثيم، والنشاط المضادة للأكسدة.

Résumé

Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel.

De nombreuses propriétés sont conférées : anti-infectieuse, antibactérienne, anti-oxydante, ...etc. les huiles essentielles sont des substances très actives et pourraient en outre constituer d'intéressants probiotiques.

La présente étude vise à l'extraction de l'huile essentielle à partir des graines de *Petroselinum Sativum* par hydrodistillation donnant un rendement optimal de 2,1%, ainsi que l'étude des paramètres influençant ce rendement.

L'huile essentielles extraite a fait l'objet d'analyses physico-chimiques de même les propriétés organoleptiques ont été déterminées.

La composition chimique des huiles essentielles des graines de *Petroselinum Sativum* à été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats de l'analyse ont montré que l'huile essentielle extraite est constituées principalement de Myristicine (23,71 %), Apiol (20,47 %), α -pinène (19,11 %), β -pinènes (13,98 %), Elemicine (11,62 %), et Limonène (4,66%).

En outre l'activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis de 3 souches bactériennes pathogènes et 3 autres souches probiotiques. Les résultats obtenus montrent une efficacité moyenne, contre les souches pathogènes à nos extraits, ainsi que la résistance remarquable des souches probiotiques suggère leur possible utilisation dans divers domaines. (Thérapeutique et alimentaire).

L'activité antioxydante à été évaluée par deux tests, test de piégage du radical libre DPPH et la réduction de Fer (FRAP). Les résultats obtenus montrent une bonne activité antioxydante de notre l'huile.

Mots clés : graines de Persil, extraction, hydrodistillation, huiles essentielles, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Summary

It is well known that essential oils extracted from plants possess pharmacological properties in both human and industrial activities.

Many properties are conferred: anti-infectious, antibacterial, antioxidant, etc. Essential oils are highly active substances and could also be interesting as probiotics.

This study aims to extract the essential oil from the seeds of *Petroselinum Sativum* by steam distillation giving optimum performance of 2,1%, and the study of the parameters influencing this yield.

The essential oil extracted has been physic-chemically analyzed of the same organoleptic properties were determined.

The chemical composition of essential oils *Petroselinum sativum* seeds was analyzed by gas chromatography. The results of the analysis showed that the essential oil extracted is composed mainly of Myristicin (23,71%), Apiol (20,47%), α -pinene (19,11%), β -pinene (13,98%), Elemicin (11,62%) and limonene (4,66%).

Additionally, the antibacterial activity was evaluated towards 3 pathogenic and 3 other probiotic strains. The results show an average efficiency of our extracts against pathogenic strains, and the remarkable resistance of the probiotic strains suggests their possible use in various fields. (Therapeutic and food).

The antioxidant activity was evaluated by two tests, trapping test of free radical DPPH and reducing iron (FRAP). The results show good antioxidant activity of our oil.

Keywords: Parsley seeds, extraction, steam distillation, essential oils, antibacterial, antioxidant activity.

Table de matière

Introduction	1
Chapitre I : Les plantes médicinales	3
I.1. Introduction	3
I.2. Aperçu historique sur la phytothérapie et les plantes médicinales	3
I.3. La phytothérapie	5
I.4. L'aromathérapie	5
I.5. Plantes médicinales	6
I.5.1. Définition des plantes	6
I.5.2. Définition des plantes médicinales	6
I.5.3. La composition chimique des plantes médicinales	6
I.6. De la cueillette à la conservation des plantes médicinales	7
I.6.1. La cueillette des plantes médicinales	7
I.6.2. Le séchage des plantes médicinales	7
I.7. La conservation des plantes médicinales	8
I.8. Les éléments actifs des plantes médicinales	8
I.8.1. Huiles essentielles	9
I.8.2. Les principes amers	9
I.8.3. Les alcaloïdes	9
I.8.4. Les tanins	9
I.8.5. Les phénols	10
I.8.6. Les flavonoïdes	10
I.8.7. Les anthocyanes	10
I.8.8. Les anthraquinones	10
I.8.9. Les saponines	11
I.8.10. Les glucosides	11
I.8.11. Les coumarines	11
I.8.12. Les polysaccharides	12
I.8.13. Les glucosinolates	12
I.8.14. Les vitamines	12

I.8.15. Les minéraux	13
I.9. Le contrôle de la qualité des plantes médicinales	13
I.10. Monographie d'une plante médicinale	13

Chapitre II : Description de la plante étudiée	15
II.1. Histoire et traditions	15
II.2. Dénomination vernaculaires	15
II.3. Classification botanique	15
II.4. Description de la plante	16
II.5. Habitat et culture	17
II.6. Principales régions de culture	18
II.7. Conservation	18
II.8. Constituants	18
II.9. Compositions des graines	19
II.10. Informations nutritionnelles	19
II.11. Composition chimique des huiles essentielles des graines de persil	21
II.12. Mode d'emploi	21
II.2.1. Usage interne	21
II.2.2. Usage externe	22
II.13. Effet et usages médicaux	22

Chapitre III : les huiles essentielles	24
III.1. Généralités sur les huiles essentielles	24
III.2. Histoire des huiles essentielles	24
III.3. Définition des huiles essentielles	25
III.4. Répartition et localisation des huiles essentielles dans les plantes	26
III.5. Les facteurs influençant la composition des huiles essentielles	26
III.6. Rendement des huiles essentielles	26
III.7. Conservation des huiles essentielles	27
III.8. Caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles	27
III.8.1. Les propriétés physiques	27
❖ La densité	27
❖ Le pH	27

❖ L'indice de réfraction	28
III.8.2. Les propriétés chimiques	28
❖ L'indice d'acide	28
❖ L'indice d'ester	28
II.9. Compositions chimiques des huiles essentielles	28
III.9.1. Les hydrocarbures terpéniques	29
III.9.2. Les composés phénylpropanes et phénoliques	29
III.9.3. Les composés divers	29
III.10. Utilisations des huiles essentielles	29
III.10.1. Utilisation pour leurs propriétés odorantes	30
III.10.2. Utilisation pour leurs propriétés médicinales	30
III.11. Les propriétés médicinales des huiles essentielles	31
III.11.1. Propriété antiviral	31
III.11.2. Propriété antifongique	31
III.11.3. Propriété antiparasitaire	31
III.11.4. Propriété antiseptique	31
III.11.5. Propriété antibactérienne	31
III.11.5.1. Une activité antibactérienne liée à la composition chimique	32
III.11.5.2. Les actifs antibactériens	32
III.11.5.3. Mode d'action contre les bactéries	32
III.11.6. Propriété antioxydante	32
III.12. Les procédés d'extraction	33
III.12.1. La distillation	33
III.12.1.1. L'entraînement à la vapeur d'eau (Stream distillation)	33
III.12.1.2. L'hydrodistillation (Water distillation)	34
III.12.1.3. L'hydrodiffusion	35
III.12.1.4. Extraction par l'expression à froid	36
III.12.2. D'autre procédé d'extraction	36
III.12.2.1. Extraction par solvants volatils	36
III.12.2.2. Extraction par solvants non volatils (par corps gras ou Macération)	38
III.12.2.3. L'enfleurage	38
III.12.2.4. Digestion	39
III.12.2.5. Extraction au four à micro-ondes	39

Chapitre IV : Matériels et méthodes	41
IV.1. Démarche expérimentale	41
IV.2. L'extraction de l'huile essentielle de <i>Petroselinum Sativum</i>	41
IV.2.1. La zone d'étude	41
IV.2.2. Matériel végétal	42
IV.2.3. Extraction de l'HE des fruits de <i>petroselinum sativum</i> par hydrodistillation	43
IV.3. Conservation d'huile essentielle obtenue	46
IV.4. Rendement en huile essentielle	46
IV.5. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle	47
IV.6. Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles	47
IV.7. Caractérisation de l'huile essentielle	47
IV.7.1. Caractères organoleptiques	47
❖ L'odeur	48
❖ La couleur	48
❖ L'aspect physique	48
IV.7.2. Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées	48
IV.7.2.1. Les propriétés physiques	48
❖ pH	48
❖ La densité relative à 20°C	49
❖ L'indice de réfraction	49
IV.7.2.2. Propriétés chimiques	51
❖ L'indice d'acide	51
❖ L'indice d'ester	52
IV.8. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle	53
IV.9. L'activité biologique	54
IV.9.1. L'activité antibactérienne	54
IV.9.1.1. Test de confirmation des souches bactérienne	54
IV.9.1.2. Préparation de l'inoculum	55
IV.9.1.3. Préparation des disques	56
IV.9.1.4. Préparation du milieu de culture	56
IV.9.1.5. Etude de l'activité antibactérienne	56
IV.9.1.6. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle	59

IV.9.2. L'activité antioxydante	60
IV.9.2.1. Test au DPPH	60
IV.9.2.2. Test de réduction de Fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	63
Chapitre V : Résultats et discussion	65
V.1. Rendement en huiles essentielles	65
V.2. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle	65
V.3. Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles	67
V.4. Caractérisation de l'huile essentielle	68
V.4.1. Propriétés organoleptique	68
V.4.2. Les propriétés physico-chimiques	69
V.4.2.1. Les caractéristiques physiques	69
❖ Le pH	69
❖ La densité	70
❖ L'indice de réfraction	70
V.4.2.2. Les caractéristiques chimiques	70
❖ L'indice d'acide	70
❖ L'indice d'ester	70
V.5. Analyse chromatographiques	71
V.6. L'activité antibactérienne	73
V.6.1. Test de confirmation des souches bactérienne	73
V.6.1.1. Etude morphologique	73
V.6.2. Réactivation des souches	77
V.6.3. Aromatogramme des souches	78
V.6.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	79
V.7. L'activité antioxydante	81
V.7.1. Test anti-radicalaire (Test DPPH)	81
V.7.2. Test de FRAP	83
Conclusion	85

Liste des tableaux

Tableau. II.1 : Les composés nutritionnels de Persil.	19
Tableau. II.2 : Composition chimique des graines de Persil.	21
Tableau. IV.1 : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.	60
Tableau. V.1 : Evolution du rendement d'extraction des HE des graines de Persil par HD en fonction du temps.	66
Tableau V.2 : Comparaison du rendement en huiles essentielles à partir des graines sèches non broyées et celui obtenue à partir des graines sèches broyées.	67
Tableau V.3 : Les caractéristiques organoleptiques de l'HE des graines de <i>Petroselinum Sativum</i> .	68
Tableau V.4 : Les caractéristiques physico-chimiques d'HE de <i>Petroselinum Sativum</i> .	69
Tableau V.5 : Composition chimique des HE de <i>Petroselinum Sativum</i> .	71
Tableau V.6 : L'aspect typique des souches pathogènes sur le milieu CHROMagar.	74
Tableau V.7 : L'aspect typique des souches probiotiques sur milieux sélectif.	75
Tableau V.8 : Coloration de Gram des souches pathogènes.	76
Tableau V.9 : Coloration de Gram des souches probiotiques.	74
Tableau V.10 : Détermination des zones d'inhibitions des HES des graines de Persil vis-à-vis des bactéries pathogènes et probiotiques.	78
Tableau V.11 : Concentration minimale inhibitrice d'HE de Persil.	80
Tableau V.12 : Le pourcentage d'inhibition du DPPH.	82
Tableau V.13 : Les résultats de l'absorbance de différente concentration d'HE.	83

Liste des figures

Fig. II.1 : Le <i>Petroselinum Sativum</i> .	16
Fig. II.2 : Les graines de Persil.	19
Fig. III.1 : Structure d'un composé phénylpropane et phénolique : vanilline.	29
Fig. III.2 : Dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau.	34
Fig. III.3 : Dispositif de l'hydrodistillation.	35
Fig. III.4 : Dispositif de l'hydrodiffusion.	36
Fig. III.5 : Les différents types d'extraction par solvants volatils.	38
Fig. III.6 : Extraction par micro-ondes.	40
Fig. IV.1 : Carte géographique de la région de récolte.	42
Fig. IV.2 : (A) graines sèches de <i>Petroselinum Sativum</i> , (B) graines sèches broyées.	43
Fig. IV.3 : Appareil de Clevenger pour l'hydrodistillation.	45
Fig. IV.4 : La formation des deux phases.	45
Fig. IV.5 : Les étapes d'extraction d'HE.	46
Fig. IV.6 : Le pH mètre.	49
Fig. IV.7 : Refractomètre.	50
Fig. IV.8 : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'acide.	51
Fig. IV.9 : Chromatographie en phase gazeuse (CPG).	53
Fig. IV.10 : Microscope.	55
Fig. IV.11 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.	57
Fig. IV.12 : Ensemencement par écouvillon.	58
Fig. IV.13 : Dépôt de disque.	58
Fig. IV.14 : Forme libre et réduite du DPPH.	61
Fig. IV.15 : Spectrophotomètre.	62
Fig. IV.16 : Mécanisme réactionnel du test de FRAP.	63
Fig. V.1: Cinétique d'extraction d'huile de Persil.	66
Fig V.2 : HE de persil extrait.	69
Fig V.3 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Petroselinum Sativum</i> .	72
Fig V.4 : des zones d'inhibitions des HES des graines de Persil vis-à-vis des bactéries pathogènes.	79
Fig V.5 : Des zones d'inhibitions des HES des graines de Persil vis-à-vis des bactéries	79

probiotiques.

Fig V.6 : Des zones d'inhibitions des HEs des graines de Persil vis-à-vis des bactéries pathogènes pour la CMI.	80
Fig V.7 : Le virage de couleur violet sombre vers le jaune pâle.	81
Fig V.8 : L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.	81
Fig V.9 : Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.	82
Fig V.10 : Absorbance en fonction de la concentration des huiles essentielles.	83
Fig V.11 : Virage de couleur de jaune au vert.	84

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AGL : Acide gras libre.

av. J.-C.) : Avant Jésus-Christ.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité Optique.

DPPH : 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle.

E.coli : Escherichia coli.

ED : Eau distillée.

ENSA : Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach- Alger.

FRAP: pouvoir antioxydant par réduction de fer.

g : Gramme. **GN** : Gélose nutritive.

h : Heure.

HCl : Acide chlorhydrique.

HD : Hydrodistillation.

HE : Huile essentielle.

IA : Indice d'acide.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50%.

IE : Indice d'ester.

IR : Indice de réfraction.

ISO : Organisation internationale de normalisation, établissons et publions des Normes internationales.

Kcal : Kilocalorie(s).

KOH : Hydroxyde de potassium.

Kp : Klebsiella pneumoniae.

l : Litre.

m : Masse.

max : Maximale.

mg : Milligramme.

M-H : Muller-Hinton.

MHE : Masse en huile essentielle.

MHG : Hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité.

ml : Millilitre.

m/m : masse/masse.

Mm : Millimètre.

M : Masse molaire.

mn : Minute.

mol/l : mole/Litre.

MRS : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

MS : La quantité de la matière végétale sèche.

nm : Nanomètre.

N : Normalité.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

RHE : Rendement en HE.

S.aureus : Staphylococcus aureus.

T : Température de mesure.

Tr : Temps de rétention.

UFC : Unité Formant Colonie.

UI : Unité internationale.

V : Volume.

µg : Microgramme.

µl : Microlitre

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'Homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux.

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, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen-Orient, constituent les civilisations phares chez lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont occupé une place de premier choix.

L'extraction des plantes médicinales est une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

Se trouvant dans le bassin méditerranéen avec de grandes variations climatiques du nord au sud, l'Algérie présente un terrain de prédilection au développement de ces cultures. La culture des plantes aromatiques et médicinales en Algérie reste traditionnelle. Elle se limite aux jardins familiaux et aux jardins d'agrément, notamment avec des espèces florales faisant l'objet de cultures de fleurs. La valorisation de ces ressources naturelles peut avoir des retombées économiques considérables pour notre pays. Récemment des projets de production des plantes aromatiques et médicinales ont vu le jour et sont essentiellement orientés vers l'exportation des plantes fraîches, d'huiles essentielles et d'huile concrète [1].

Dans le but de continuer à exploiter les plantes poussant en Algérie et réputées pour leurs vertus médicinales, nous avons étudié la plante médicinale qui est le Persil.

Introduction

Pour cela nous avons fixés les objectifs suivants :

- Extraction des huiles essentielles à partir des graines de *Petroselinum Sativum* par hydrodistillation à l'échelle laboratoire.
- Etude de l'activité antibactérienne et antioxydante.

Chapitre I:

Les plantes médicinales

Chapitre I : Les plantes médicinales

I.1. Introduction

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se parfumer, se chauffer,...mais également pour se soigner [2]. Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiées. Elles accumulent des métabolites dits secondaires parmi lesquels, les huiles essentielles très utilisées par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [3].

I.2. Aperçu historique sur la phytothérapie et les plantes médicinales

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre? Le hasard? La religion? La superstition? L'expérience, certainement.

Plusieurs théoriciens ont entrepris d'expliquer l'action des plantes sur l'organisme. Dans l'Antiquité gréco-romaine, mentionnons les grands médecins grecs : Hippocrate (460-v. 377 av. J.-C.) ; Dioscoride (1^o siècle apr. J.-C.), Galien (v. 131-v. 201) ; pour sa part, le Romain Pline l'Ancien (23-79), à la fois amiral, écrivain et naturaliste, a écrit une Histoire naturelle en 37 volumes. L'ouvrage de Dioscoride Sur la matière médicale (De materia medica), qui décrivait tous les médicaments en usage à son époque, demeura l'une des sources les plus consultées par les médecins jusqu'à l'aube du XIX^e siècle.

Au XVI^e siècle, la célèbre école italienne de Salerne a marqué la médecine de son temps. Elle conseillait au roi « de conserver un esprit gai, de se ménager du repos, et de se contenter d'une alimentation modeste»; aujourd'hui, ces conseils pourraient être suivis judicieusement par chacun d'entre nous [4].

Jusqu'au XIX^e siècle, les médecins se contentaient, pratiquement, de puiser dans la «pharmacie du bon Dieu» pour soulager les maux de leurs contemporains. C'est alors que les chimistes ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes importantes (la quinine du quinquina, la digitaline de la digitale, etc.). Poursuivant leurs recherches, au début du XX^e siècle, ils ont fabriqué des molécules synthétiques. Désormais, croyait-on, on allait prescrire

Chapitre I : les plantes médicinales

exclusivement des médicaments issus des cornues, les plantes ne servant plus que de réserves à molécules chimiques utiles.

Excessive, cette vision a engendré par contrecoup une « vague verte », un renouveau de la phytothérapie suscité par l'attente d'une grande partie de la population, en accord avec « l'esprit écologique » actuel. Mais, au-delà de ce courant, l'utilisation des plantes relève d'une philosophie déjà exprimée dans l'un des livres de la Bible, l'Ecclésiaste : « Le Seigneur fait produire à la Terre ses médicaments et l'homme sensé ne les dédaignera pas ».

Récemment, des médecins et des professeurs dynamiques ont créé des centres de formation en phytothérapie (dans des universités ou dans des institutions privées).

Ils expérimentent de nouvelles plantes (comme *Harpagophytum procumbens*), modernisent la présentation des médicaments et rendent ceux-ci plus efficaces (par exemple, les nébulisats ou extraits secs de plantes sont prescrits sous forme de gélules). En outre, on procède à des expériences en milieu hospitalier. Au CHRU (Centre hospitalier de recherche universitaire) de Clermont-Ferrand, le professeur Pierre Bastide a, entre autres expériences, testé les vertus curatives des huiles essentielles de cannelle et de girofle sur les infections de l'appareil urinaire [4].

L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries. Il y a une vingtaine d'années, les docteurs Maurice Girault et Paul Belaiche ont mis au point l'aromatogramme, méthode comparable à l'antibiogramme, qui permet de déceler quelles sont les huiles essentielles les plus efficaces sur un germe donné.

Cette période faste de la phytothérapie a été interrompue en France par un décret de 1991 supprimant les remboursements de toutes les préparations magistrales, c'est-à-dire des médicaments préparés par le pharmacien selon une prescription établie par un médecin pour traiter le cas particulier de son malade. Ce fut un coup dur porté à la phytothérapie !

Une décision similaire a été adoptée en 1997 en Belgique. Les phytothérapeutes ont constaté, depuis, une baisse importante de la fréquentation de leur cabinet.

De plus, le nombre des candidats à l'étude de la phytothérapie diminue, le montant des investissements consacrés à la recherche décline et les tests cliniques se raréfient.

Le recours à la phytothérapie n'a pas disparu pour autant. Il a changé de forme : l'automédication remplace, pour une large part, la prescription [4].

I.3. La phytothérapie

Ce mot vient du grec *phuton* qui signifie « plante » et *therapeia* qui signifie « traitement, soins » [5].

La phytothérapie désigne la médecine par les plantes.

La phytothérapie, c'est l'emploi de médicaments végétaux pour soigner les différents maux dont vous pouvez être victime. On utilise ainsi fleurs, feuilles, racines voire plantes entières cueillies dans la nature environnante mise en œuvre sous forme de tisanes, de gélules, de teintures mères homéopathiques, d'extraits [6].

On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés [7].

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [4].

I.4. L'aromathérapie

Aromathérapie vient du grec arôma, « odeur » et thérapie, « soins ». Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants [7].

Chapitre I : les plantes médicinales

L'aromathérapie, C'est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques. L'aromathérapie, dont le mot n'est apparu qu'en 1930, est une branche de la phytothérapie. La phytothérapie se décline sous de très nombreuses formes (tisanes, extraits secs ou fluides, macérâts, sirops, suspensions intégrales de plantes fraîches..) utilisant diverses parties de la plante. En aromathérapie, on utilise le plus souvent une seule partie de la plante, parfois la plante entières [8].

I.5. Plantes médicinales

I.5.1. Définition des plantes

Les plantes sont comme des êtres humains au même titre que les êtres vivants, mais qui ne peuvent pas se déplacer et qui par conséquent se nourrissent et se reproduisent sur place. Elles sont de forme, de taille et de caractère différents. Ce sont des êtres organisés et vivants privés de la faculté de se mouvoir, puisant dans les milieux ou ils sont placés (air, eau, sol) les matières anorganiques nécessaires à l'entretien et à l'accroissement de leurs organes, et se reproduisant au moyen de germes qui naissent soit à leur surface, soit, plus souvent, dans leur intérieur.

De par leurs actions, on distingue trois catégories de plantes :

- Les plantes alimentaires qui calment la faim,
- Les plantes vénéneuses qui entraînent la mort,
- Les plantes médicamenteuses qui combattent les maladies [9].

C'est cette dernière catégorie qui nous intéresse et qu'il convient d'analyser profondément.

I.5.2. Définition des plantes médicinales

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant êtres utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles [10].

I.5.3. La composition chimique des plantes médicinales

La composition chimique des plantes médicinales dépend de plusieurs facteurs :

- D'abord du climat et de la nature du sol sur lequel elles sont cultivées,

- Ensuite de leur âge,
- Enfin de leur cueillette, leur disséction et leur conservation [9].

I.6. De la cueillette à la conservation des plantes médicinales

I.6.1. La cueillette des plantes médicinales

Il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec et chaud : les plantes mouillées de pluie ou de rosée s'altèrent, moisissent, fermentent et perdent, de toute façon, toute valeur thérapeutique. Le matin est le moment le plus favorable, mais on peut toutefois cueillir aussi le soir, avant la fraîcheur [11].

En, général, il est conseillé de ne prélever qu'une partie des feuilles et des fleurs a fin de ne pas endommager la plante et de permettre aux fleurs restantes de former leurs graines.

De plus, certaines parties de la plante doivent être cueillies à des moments précis dans l'année : les graines devront en général être récoltées lorsqu'elles sont à maturité, les racines seront quant à elle prélevées au début du printemps ou à l'automne, car de nombreuses plantes sont alors en phase de repos et ont conséquemment stocké la majeure partie de leurs substances utiles dans leurs organes souterrains [12].

Il n'est pas possible d'indiquer avec exactitude la période de la récolte des plantes, car celle-ci varie selon les espèces [9].

I.6.2. Le séchage des plantes médicinales

Une fois la récolte terminée, les plantes sont séchées afin d'éviter tout risque de pourriture.

Cette opération est aussi délicate que la première. Il s'agit surtout de diminuer la plus possible la quantité d'eau contenue dans les plantes. C'est aussi l'une des raisons pour laquelle pendant la cueillette, un panier ou un cageot mieux qu'un sac en plastique.

Avant le séchage, les plantes doivent être soigneusement nettoyées-mais pas à l'eau. Elles doivent être débarrassées des portions mortes ou pourries, de la terre, bref de tous les corps étrangers greffés sur elles. Ensuite, elles doivent être étalées en fines couches sur une toile dans une pièce aérée et pas humide et remuées chaque jour pour laisser passer de

Chapitre I : les plantes médicinales

l'air.une autre façon de sécher les plantes serait de les accrocher à un fil dans une pièce, un peu comme des guirlandes.

Les fleurs ne doivent pas être exposées au soleil, autrement dit leur couleur s'en trouverait altérée.

Afin d'accélérer le processus de séchage, les tiges, les racines et les fruits peuvent d'abord être découpés en morceaux avant être placés en couches sur une toile de séchage.

Lorsque le séchage est lent ou incomplet, la plante ou partie de la plante risque de pourrir ou de perdre ses vertus thérapeutiques.

La durée du séchage est surtout fonction de la partie à sécher. Cela ne fait pas l'ombre d'un doute que les feuilles et les fleurs sécheront bien plus vite que les racines, la tige, l'écorce et les fruits [9].

I.7. La conservation des plantes médicinales

Les plantes séchées ne doivent être exposées ni à la lumière, ni à la poussière, et surtout, elles doivent être placées dans des endroits sec. Le nom et la date de récolte doivent être indiqués [9].

I.8. Les éléments actifs des plantes médicinales

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine [13].

Nous vous présentons ci- après les composants les plus importants des plantes médicinales [12].

I.8.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles végétales sont des composés volatils, oléagineux, dans la plupart des cas à la senteur aromatique, qui peuvent avoir une action très variée. Certaines possèdent ainsi des vertus anti-inflammatoires, tandis que d'autres sont antispasmodiques, diurétiques ou expectorantes ; il existe également des huiles essentielles qui peuvent provoquer des irritations cutanées lorsqu'on les utilise de façon externe mais stimulent ainsi la circulation sanguine dans la zone traitée [12].

I.8.2. Les principes amers

Les principes amers contenus dans les plantes ne constituent pas un groupe homogène ; toutes ces substances, qui peuvent elles par l'amertume de leur goût.

L'action thérapeutique des principes amers est due au fait qu'ils augmentent la sécrétion des sucs digestifs et de la bile, ce qui stimule l'appétit tout en facilitant la digestion ; on prête de plus à certains une action fortifiante [12].

I.8.3. Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (-N-) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées c'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea*) employé pour traiter certains types de cancer.

D'autres alcaloïdes comme l'atropine [4], extraite de belladone mortellement toxique (*atropa belladonna*), et qui peut cependant être utilisée à faibles doses dans une optique thérapeutique, font partie de la famille des alcaloïdes [12].

I.8.4. Les tanins

Les tanins, ou acides tanniques, sont des composés organiques complexes présents dans pratiquement toutes les plantes à des concentrations diverses. Ils sont souvent contenus dans l'écorce ou dans les feuilles, ce qui leur donne un goût piquant désagréable et rend immangeables (impropres à la consommation) pour les insectes ou le bétail [12].

Chapitre I : les plantes médicinales

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [4].

I.8.5. Les phénols

Les phénols, caractérisés par leur structure en anneau, comprennent notamment l'acide salicylique, à partir duquel la célèbre aspirine a été développée. Les phénols étaient autrefois utilisés pour désinfecter les blessures, mais à hautes doses ils peuvent provoquer de fortes irritations cutanées [12].

Les phénols sont anti-inflammatoires, antiseptiques, antioxydants, et peuvent avoir des propriétés antivirales [4].

I.8.6. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie [4].

I.8.7. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleues, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux [4].

I.8.8. Les anthraquinones

Ce sont des composés aromatiques qui agissent sur la constipation. Ils ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales et

stimulent les évacuations environ dix heures après la prise.ils rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal [4].

I.8.9. Les saponines

Les saponines sont des glucosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec de l'eau (sapo=savon). Il existe deux groupes différents de saponines : les saponines triterpènes et les saponines stéroïdes. Ces dernières ont une ressemblance structurelle avec les hormones stéroïdes du corps humain et ont donc parfois une activité hormonale lorsqu'on les utilise. Les saponines triterpènes sont souvent des expectorants très puissants, c'est-à-dire des substances qui facilitent l'évacuation des sécrétions des voies respiratoires et des bronches. On trouve par exemple des saponines stéroïdes dans la réglisse glabre (*glycyrrhiza glabra*) et des saponines triterpènes dans la primevère officinale (*primula veris*) [12].

I.8.10. Les glucosides

Les glucosides sont des composés organiques. Comme ils ont souvent des actions différentes, ils sont répartis en divers sous groupes dont le plus important est représenté par les glucosides cardiotoniques utilisés pour augmenter l'activité cardiaque lorsqu'elle est insuffisante. Ils ont en général aussi des propriétés diurétiques ce qui entraîne une diminution des liquides dans les tissus et fait ainsi baisser la pression artérielle [12].

I.8.11. Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du mélilot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang alors que les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le céleri (*Apium graveolens*), soignent les affections cutanées et que la khelline de la khella (*Ammi visnaga*) est un puissant vasodilatateur coronarien [4].

I.8.12. Les polysaccharides

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages «visqueux» et les graines. Le mucilage et la gomme absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés, par exemple quand la peau est sèche et irritée ou la paroi des intestins enflammée et douloureuse. La meilleure façon de préparer les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) et le lin (*linum usitatissimum*) est de les gorger d'eau froide (de les faire macérer). Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines, sont utilisés en cosmétologie [4].

I.8.13. Les glucosinolates

Présents uniquement dans les espèces de la famille des moutardes et des choux, les glucosinolates provoquent un effet irritant sur la peau, causant inflammation et ampoules. Appliqués comme cataplasme sur les articulations douloureuses, ils augmentent le flux sanguin dans la zone irritée, favorisant ainsi l'évacuation des toxines. Lorsqu'on les ingère, les glucosinolates se désagrègent et produisent un goût très prononcé. Le radis (*Raphanus sativus*) et le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) sont des plantes à glucosinolates typiques [4].

I.8.14. Les vitamines

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le citronnier notamment (*Citrus limon*) contient des doses élevées de vitamine C et la carotte (*Daucus carota*) est riche en β -carotène (pro vitamine A).

Le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*), par exemple, contient des doses élevées de vitamine B1, B2, C et E et de β -carotène tandis que l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) peut être considéré comme un complément vitaminique et minéral en tant que tel [12].

I.8.15. Les minéraux

Certaines plantes médicinales contiennent également beaucoup de minéraux, c'est-à-dire des substances inorganiques qui sont nécessaires à la construction des tissus protecteurs, à la synthèse des enzymes et au bon fonctionnement du système nerveux. Parmi les plantes riches en minéraux on peut citer par exemple le persil frisé (*petroselinum crispum var. crispum*) ou la grande ortie (*Urtica dioica*), qui contiennent beaucoup de fer, tandis que le pissenlit (*taraxacum officinale*) a une teneur importante en potassium [12].

I.9. Le contrôle de la qualité des plantes médicinales

Afin de tirer le meilleur parti des plantes médicinales, il convient de veiller à ce que les herbes et leurs dérivés soient d'excellente qualité. Cela exige qu'elles soient cultivées dans de bonnes conditions, correctement séchées, bien conservées et que leur date limite de consommation soit respectée. Le recours à des plantes de mauvaise qualité est bien souvent une perte de temps et d'argent étant donné que vous n'en tirerez pas tous les bienfaits. S'agissant de plantes médicinales, la qualité prime avant tout [4].

I.10. Monographie d'une plante médicinale

On entend par monographie la description complète de la plante, permettant :

- De l'identifier en éliminant tout risque d'erreur, de confusions ou de falsifications possibles ;
- De connaître sa composition ;
- De repérer les propriétés qui expliquent les emplois, la toxicité, les effets indésirables, les contre-indications...

Toute monographie s'organise comme suit :

- Définition : nom français, nom latin, famille, drogue, législation (appartenance à une liste des substances vénéneuses) ;
- Etude botanique :
 - Description de la plante, origine et récolte ;
 - Caractères de la drogue : macroscopiques et organoleptiques, microscopiques, risques de falsifications éventuelles ;

Chapitre I : les plantes médicinales

- Composition chimique : eau, substances minérales, substances diverses, principes actifs ;
- Action physiologique : toxicité, action sur les fonctions et les organes ;
- Essais : toute monographie précise quelles sont les méthodes et analyses permettant de vérifier les caractères botaniques, physico-chimiques et physiologiques décrits ;
- Emplois : indications thérapeutiques, posologie, précautions d'emploi... **[14]**.

Chapitre II:

Description de la plante étudiée

Chapitre II : Description de la plante étudiée

II.1. Histoire et traditions

Le persil était déjà connu dans la Grèce et la Rome antiques, mais davantage pour ses vertus médicinales que comme aromate.

A Rome, le persil était associé à la déesse Perséphone, reine du monde souterrain, et était employé lors des cérémonies funéraires. Il possède la particularité de masquer les odeurs fortes, notamment celle de l'ail c'est l'une des raisons pour lesquelles il est fréquemment utilisé dans les préparations culinaires (salades ou plats) [4].

II.2. Dénomination vernaculaires

- **Français** : Persil commun (p. simple), Persil Jaubert, Persil à grosse racine, Persil bulbeux (p. tubuleux), Persil des jardins, Persil odorant, Persil cultivé ;
- **Allemand** : Petersilie, Garten-Petersilie, Gartenepich, Petersil, Peterle, Peterlin, Peterling, Peterli, Bittersilche ;
- **Anglais** : Parsely, Turnip rooted persely;
- **Algérien**: Maadnous, imzi.

Le terme maâdnous est indiqué par Abderrezaq El-djazairi. C'est une altération de maqdnous, mentionné par Ibn El-Batar. L'origine du mot semble t-il byzantine : Makedonision [15].

II.3. Classification botanique

Classification de Cronquist (1981) :

Règne : *Plantae*.

Sous règne : *Tracheobionta*.

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous classe : *Rosidae*.

Ordre : *Apiales*.

Chapitre II : Description de la plante étudiée

Famille : *Apiaceae*.

Genre : *Petroselinum*.

Nom binominal : *Petroselinum crispum*.

Synonyme : *Petroselinum sativum* [15].



Fig. II.1 : Le *Petroselinum Sativum* [4].

II.4. Description de la plante

Le persil commun est une plante herbacée bisannuelle qui émet la première année une touffe de feuilles atteignant 20 à 30 cm, et la deuxième année une hampe florale qui peut monter jusqu'à plus de 60 cm.

Les feuilles sont munies d'un long pétiole légèrement creusé en gouttière. Elles sont vert vif, brillantes, peu épaisses, très découpées, aux lobes triangulaires.

Les fleurs sont petites (2 mm environ), jaunâtres, disposées en ombelles aplaties comprenant de huit à vingt rayons [17].

II.5. Habitat et culture

Le persil est originaire d'Europe et de l'ouest du bassin méditerranéen. Aujourd'hui, il pousse rarement à l'état sauvage, mais on le cultive dans le monde entier comme plante aromatique et pour ses propriétés nutritives [4].

+ Emplacement :

Le persil apprécie les sols drainés mais humides, riches en humus et calcaires. On peut le placer dans un lieu ensoleillé ou mi-ombragé. Le persil pousse très bien en pot, à condition qu'il soit suffisamment profond pour sa racine pivotante.

+ Multiplication et entretien :

Les semences, récoltées en septembre ou en octobre, sont mises en terre au printemps ou en été jusqu'en août, en lignes espacées de 30 cm environ. **Arroser** le semis avec de l'eau tiède. Les graines sont très lentes à germer (au mois trois semaines), et le semis doit être maintenu humide. Afin de hâter la germination, il est souvent conseillé de faire tremper les graines dans l'eau tiède pendant une journée. Le semis doit être reconduit à chaque printemps si l'on veut profiter de feuilles fraîches et tendres.

Le sol doit être maintenu humide, surtout aux premiers jours de croissance. **Éclaircissez** le semis à 10 cm, puis une seconde fois à 20 cm. De plus, il faut continuer à bien désherber les rangées. **Coupez** les tiges florales (tiges porteuses de fleurs) si elles apparaissent, afin de prolonger la vie du plant et d'avoir des feuilles plus tendres.

+ Récolte :

On récolte les feuilles en coupant le pétiole à la base. On peut prolonger sa fraîcheur quelques jours en laissant tremper le pétiole des feuilles dans un verre d'eau. Le séchage des feuilles n'est pas recommandé. En revanche, elles se conservent très bien au congélateur [14].

On récolte les feuilles au printemps et à l'automne et les graines dès qu'elles arrivent à maturité [4].

II.6. Principales régions de culture

Tous les pays d'Europe, notamment la France, l'Allemagne, le groupement des États indépendants et les Balkans, mais aussi le nord et l'est de l'Afrique, l'Asie (Inde, Malaisie, Indonésie, Chine, Philippines) et l'Argentine, Brésil, États unis [7].

II.7. Conservation

Les bouquets de persil (tiges, feuilles) peuvent être conservés quelques jours dans de l'eau ou enveloppés dans une feuille absorbante humide, et jusqu'à 8 semaines au réfrigérateur à une température comprise entre -1 et +2 ° C. Les feuilles peuvent aussi être conservées 9 à 12 mois au congélateur après avoir retiré les pétioles, ou finement hachées dans des bacs à glaçons avec un peu d'eau.

Une fois congelé, le persil est beaucoup moins aromatique que frais et après décongélation, il se ramollit et ne peut plus être employé comme garniture.

Les feuilles se font sécher à l'ombre mais à l'air et se conservent dans un sachet de papier. Le séchage des feuilles conduit à une perte d'arôme.

Les racines fraîches peuvent être stockées pendant 6 mois à des températures allant de 2 à 7 ° C, sous réserve d'une bonne aération et d'une forte humidité (60 à 95 %).

Mais une fois séchées elles doivent être protégées de l'humidité et de la lumière en prenant soin de les stocker dans un récipient hermétique.

Les graines se font sécher au soleil et se conservent comme les racines [15].

II.8. Constituants

Le persil est riche en principes actifs qui ont des actions différentes sur le corps : huile essentielle (apiol 18%, myristicine 20% et plusieurs autres terpènes), glucosides (apiine...), flavonoïdes, coumarines (bergapten...), mucilage, enzymes, alcaloïdes, acides pétrosélinique, éléments minéraux (fer en quantité élevée, phosphore, calcium), d'antioxydants [7].

Chapitre II : Description de la plante étudiée

Le persil est notamment une source extraordinaire de vitamine C : 200 mg pour 100 g c'est quatre fois plus que l'orange (même si on n'en ingère pas les mêmes quantités !), et contient aussi de vitamine A, B, et E [17].

L'huile essentielle de feuille contient du p-menthatriène-1.3.8 à 50%, apiol et myristicine [7].

II.9. Compositions des graines

Les graines de persil contiennent de 3 à 7% d'une huile jaunâtre dont le profil chimique varie selon les chimiotypes. Les usages de cette huile essentielle sont assez limités mais elle entre notamment dans la composition de mélanges aromatiques utilisés dans l'industrie alimentaire.

La graine contient 13% de substance azotés et de 17 à 23% de lipides dont 65% d'acides gras totaux [15].



Fig. II.2 : Les graines de persil.

II.10. Informations nutritionnelles

Tableau. II.1 : Les composés nutritionnels de persil [16].

Chapitre II : Description de la plante étudiée

Nutriments	Valeur pour 100 g
Eau (g)	87.71
Energie (Kcal)	36
Protéine (g)	2.97
lipides totaux (g)	0.79
hydrate de carbone (g)	6.33
Fibres (g)	3.33
Sucres (g)	0.85
Les minéraux	
Calcium, Ca (mg)	138
Fer, Fe (mg)	6.20
Magnesium, Mg (mg)	50
Phosphore, P (mg)	58
Potassium, K (mg)	554
Sodium, Na (mg)	56
Zinc, Zn (mg)	1.07
Les vitamines	
Vitamin C (mg)	133.0
Thiamine (mg)	0.086
Riboflavin (mg)	0.098
Niacin (mg)	1.313
Vitamin B6 (mg)	0.090
Folate (µg)	152
Vitamin B12 (µg)	0.00
Vitamin A (µg)	421
Vitamin A (UI)	8424
Vitamin E (µg)	0.75
Vitamin D (µg)	0.0
Vitamin K (µg)	1640.0
Les lipides	
Acides gras saturés (g)	0.132
Acides gras mono insaturé (g)	0.295
Acides gras poly insaturé (g)	0.124
Cholestérol (mg)	0
Autres	
Caféine (mg)	0

Chapitre II : Description de la plante étudiée

II.11. Composition chimique des huiles essentielles des graines de persil

Tableau. II.2 : Composition chimique des graines de persil [7].

Composées	La teneur en %
α -pinène	17.14
β -pinène	11.36
Myrcène	0
Sabinène	0.64
Limonène	0.45
Monoterpénols : α -terpinéol	0
Sesquiterpénols : carotol	0.60
Ethers-oxydes : Myristicine	37.13
Apiole	14.42
Elémicine	3.1
1-allyl-2, 3, 4, 5tétramétoxybenzène	7.27

Remarque

L'emploi des feuilles et des racines du persil comme condiment et aux doses usuelles ne présente aucune toxicité aiguë ou chronique. Il n'est par contre pas recommandé de consommer les fruits, car ils biosynthétisent de grandes quantités de dérivés du phénylpropane, toxique à forte doses. Elles sont déconseillées en cas de grossesse, de maladie rénale ou de cirrhose du foie [4].

II.12. Mode d'emploi

Le mode d'emploi de persil se fait par deux usages (interne et externe).

II.2.1. Usage interne

- Infusion de persil séché : mettre 30 à 60 g par litre d'eau bouillante.

Chapitre II : Description de la plante étudiée

- Infusion des graines : 6 à 10 g par litre d'eau. Dans les deux cas, boire de 3 à 4 tasses par jour.
- Infusion des racines séchées : 60 à 70 g de racines pour un litre d'eau. Laisser reposer pendant une demi-heure. Prendre 3 à 4 tasses par jour, pour aller jusqu'à 8 tasses en cas d'oligurie, d'œdèmes de réduction urinaires et de trouble hépatiques avec grossissement du foie. Ne pas omettre de consulter un médecin.
- Suc de plante fraîche : 100 à 150 g par jour à prendre par petites cuillérées.
- Décoction : 50 g de semences, de racines ou de feuilles. Mettre à bouillir 5 mn et laisser infuser 15 mn : 2 tasses par jour [15].

II.2.2. Usage externe

Cataplasme de feuilles fraîches : appliqué sur les seins pour tarir le lait des nourrices.

Même procédé pour les contusions, les ecchymoses, les piqures, les abcès les névralgies et même dentaires [15].

II.13. Effet et usages médicaux

En raison de sa teneur en huile essentielle, le persil stimule les sécrétions gastriques et biliaires et favorise ainsi la digestion.

L'ajout de persil dans la nourriture pendant 2 semaines augmente l'activité d'enzymes antioxydantes telles que comme la glutathion-réductase et le superoxyde-dismutase, capable de piéger les radicaux oxygénés [15].

Les feuilles fraîches sont très nutritives et constituent un apport naturel en vitamines et en minéraux. [4] Grâce à la présence de ces nombreuses vitamines et minéraux Il a des vertus revitalisantes et reminéralisantes. Il est conseillé aux personnes fatiguées, anémiées, manquant d'appétit...

Les flavonoïdes sont anti-inflammatoires et antioxydants. La myristicine et l'apiol sont diurétiques, vermifuge, utile en cas d'anémie, asthénie trouble de l'appareil génito-urinaire, rétention urinaire de prostate, trouble de l'appareil circulatoire, règles insuffisances ou douloureuses, nervosité, recommandé durant la croissance [15].

Chapitre II : Description de la plante étudiée

Les graines ont une action diurétique plus efficace que les feuilles dans le traitement de la goutte, des rhumatismes et de l'arthrite.

Le persil provoque les règles et soulage les douleurs menstruelles.

L'huile essentielle soulage les coliques, diminue les flatulences et stimule l'utérus [4].

Le persil combat les gaz intestinaux et l'hypertension.

C'est l'allié d'une bonne hygiène buccodentaire : il aide à lutter contre les petites infections de la bouche et la mauvaise haleine (mastiquer une feuille rafraîchit l'haleine) [17].

Il a des vertus détox et diurétique. En clair, il aide à éliminer !

Grâce à sa richesse en vitamines et minéraux, c'est aussi un excellent allié beauté, notamment pour les peaux et les cheveux fatigués.

A conseiller aussi à ceux et celles qui ont la peau sensible ! [18].

L'huile essentielle de persil est également bénéfique en usage externe. Elle diminue les douleurs articulaires et musculaires causées par la goutte. Par ailleurs, l'utilisation de l'huile essentielle de persil est une méthode naturelle efficace pour soulager les hémorroïdes et les varices. Utilisez ce produit lors d'un bain aromatique ou une séance de massage pour profiter pleinement de tous ces bienfaits. Utilisée en inhalation, l'huile essentielle dégage les voies respiratoires pour combattre l'asthme et la toux [7].

Chapitre III:

Les huiles essentielles

Chapitre III : Les huiles essentielles

III.1. Généralités sur les huiles essentielles

Contrairement à ce que pourrait laisser croire leur appellation, les huiles essentielles ne contiennent aucun corps gras, donc pas d'huile à proprement parler [19].

Le terme huiles essentielles (HEs) dérive de « quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante [20].

Dès la plus haute antiquité (5000 ans au moins), les huiles essentielles sont reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées en Chine, en Inde, au Moyen Orient, Egypte, en Grèce, en Amérique latine (aztèques, Mayas, Incas) et en Afrique [7].

III.2. Histoire des huiles essentielles

Les huiles sont connues depuis des millénaires pour leur action bénéfique sur l'homme. Quatre mille ans avant J.C, les égyptiens utilisaient déjà les huiles comme parfum dans les momifications des corps. Il faudra attendre de *XVI^{ème}* siècle pour voir apparaître la généralisation de la production et de l'utilisation des huiles essentielles, grâce aux travaux sur les huiles essentielles de romarin, de bois de genièvre, de lavande.

L'histoire de l'aromathérapie, qui est celle des huiles essentielles, peut se résumer en quatre époques suivantes :

- L'époque au cours de laquelle étaient utilisées des plantes aromatiques telles quelles ou sous forme d'infusion ou décoctions :
- Celle dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale. A cette époque, intervient la notion d'activité liée à la substance odorante.
- La troisième correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Apparaît alors le concept d'huile essentielle qui aboutit à la création et au développement de la distillation :

Chapitre III : Les huiles essentielles

- Enfin, la dernière qui est la période moderne dans laquelle la connaissance des composants des huiles essentielles intervient et explique les effets physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques, voire électroniques des arômes végétaux.

La valeur médicinale des plantes est la plus en plus prouvée scientifiquement, c'est ce qui constitue d'ailleurs un argument de taille pour leur usage en médecine [1].

III.3. Définition des huiles essentielles

Les parfums qu'exhalent certaines plantes sont dus à des molécules volatiles que l'on désigne globalement par le terme "essence". L'huile essentielle correspond à l'extrait obtenu par entraînement à la vapeur d'eau de l'organe végétal où a lieu le stockage de l'essence [19]. Elles diffèrent des huiles fixes (huile d'olive,...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique [1]. Ces composés volatils ont la propriété d'être solubles dans l'huile et les graisses et ont, de ce fait, reçu le nom d'huile essentielle. Le terme "huile" souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances [21].

Huile essentielle est définie comme : « Un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale soit par entraînement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation « sèche ».

L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premières modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [1].

Cette définition détermine les huiles essentielles au sens strict. Mais il est important de distinguer entre essences et huiles essentielles :

- ✚ Essence : sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée.
- ✚ Huile essentielle : extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée [22].

Selon la pharmacopée européenne, ce sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

Chapitre III : Les huiles essentielles

Elles sont connues sous différents noms, on les appelle couramment :

Huiles essentielles, Essences ou essences aromatiques, Essences végétales, Essences de plantes, Huiles distillées, Huiles aromatiques, Huiles volatiles ou étherées, Esprits recteurs, Oléules, Aromes [15].

III.4. Répartition et localisation des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : des fleurs, des feuilles, des écorces, des fruits, des bois, des racines, et des rhizomes.

Dans le cas le plus simple, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules ou, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales. D'autres structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles. Ces structures regroupent les poils et canaux secteurs et les poches sécrétrices [1].

III.5. Les facteurs influençant la composition des huiles essentielles

Des travaux de recherche ont montré que la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. Les principaux facteurs de variabilité de cette composition sont d'origine intrinsèques (dépend de la plante elle-même : origine botanique, l'organe végétal concerné, les chémotypes, cycle biologique), facteur extrinsèques (touchent particulièrement les conditions écologiques : facteurs climatiques, facteurs pédologiques, facteurs écologiques et des facteurs géographiques) et des facteurs technologiques (le mode d'extraction des huiles essentielles et la masse végétale, la durée et la vitesse de la distillation) [7].

III.6. Rendement des huiles essentielles

Les quantités des huiles essentielles produites par les plantes sont minimales, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2 %, mais pouvant atteindre 50% dans le cas de l'huile essentielle de baume [7].

III.7. Conservation des huiles essentielles

Les possibilités de dégradation des huiles essentielles sont nombreuses. Et certains facteurs majeurs doivent être pris en compte :

Il s'agit principalement de la lumière, de la température, de l'humidité et de récipients de stockage. C'est pourquoi elles sont livrées dans des flacons de verre teintes et doivent être conservées dans un endroit frais et qu'elles se conservent entre 12 et 18 mois après leur fabrication, car, avec le temps, leur propriété tendent à décroître [22].

III.8. Caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles

III.8.1. Les propriétés physiques

❖ La densité

La densité d'une HE constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une HE dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, chimique, etc...). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'adultération.

La densité (la masse volumique) est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un HE par unité de volume [23].

❖ Le pH

Le potentiel d'hydrogène (pH) est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse (le pH mesure l'activité des ions hydrogènes H^+ en solution).

Le pH est une des variables utilisées pour caractériser les propriétés des milieux. Le pH est utilisé dans de nombreux domaines comme variable opératoire, caractérisation du produit fini ou encore à des fins de contrôle de qualité. De nombreuses études se sont attachées à corrélérer sa valeur à des lois cinétiques de réactions, des qualités organoleptiques de produits ou encore des activités enzymatiques [24].

❖ L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est une caractéristique physique souvent utilisée dans les analyses des produits industriels ou naturels afin de vérifier la pureté [25].

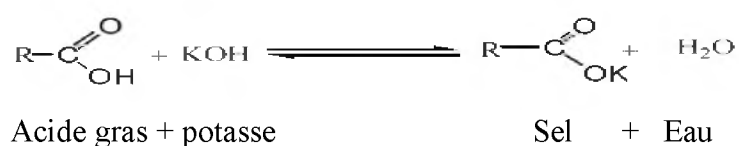
III.8.2. Les propriétés chimiques

❖ L'indice d'acide

C'est une analyse qui détermine le degré d'altération de l'huile végétale. Au cours du temps les triglycérides qui constituent l'huile s'hydrolysent lentement pour donner le glycérol et les acides gras correspondants de ce fait un corps gras contient toujours plus ou moins une grande quantité d'acide libre.

Pour chiffrer cette teneur on utilise l'indice d'acide : c'est la masse d'hydroxyde de potassium (KOH) exprimée en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g de matière grasse [26].

L'équation de la réaction est la suivante:



❖ L'indice d'ester

Il s'agit du nombre de milligrammes de KOH nécessaires à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse en milieu basique (saponification) des esters contenus dans 1g d'HE. La potasse réagit sur les esters selon une réaction dite de saponification : [27].



III.9. Compositions chimiques des huiles essentielles

L'huile essentielle est un mélange complexe de molécules odorantes. C'est un liquide homogène, bien que constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures présentes. Nous présenterons, les principales familles de molécules odorantes [21].

III.9.1. Les hydrocarbures terpéniques

Exemple : les monoterpènes, les sesquiterpéniques, les diterpènes, les sesterpènes, les triterpènes, les polyterpènes [21].

III.9.2. Les composés phénylpropanes et phénoliques

Ce sont des huiles essentielles à forte teneur en composés aromatiques [28], parmi lesquels on peut citer le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugénol, le cinnamaldéhyde et la vanilline (**Fig III.1**). Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits) [29].

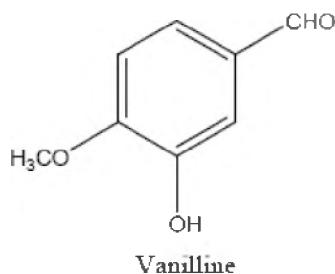


Fig. III.1 : Structure d'un composé phénylpropane et phénolique : **vanilline**.

III.9.3. Les composés divers

N'appartenant pas à ces deux groupes, peuvent se rencontrer dans les huiles essentielles : acides gras, alcools, aldéhydes, esters ou lactones acycliques et exceptionnellement des composants contenant de l'azote, du soufre ou des coumarines, et de quelques autres, dont certains indéfinis, tous en proportions variées en fonction de chaque essence, et ne contiennent ni acides gras, ni vitamines, ni sels minéraux [29].

III.10. Utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont, principalement, utilisées en raison de leurs propriétés odorantes d'une part, et de leurs propriétés médicinales [22].

III.10.1. Utilisation pour leurs propriétés odorantes

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums ; dans les composites parfumantes des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle ; mais aussi dans le domaine alimentaire. L'utilisation des huiles essentielles pour l'élaboration des parfums est évidente. Dans le secteur de la parfumerie fonctionnelle, les huiles essentielles sont sélectionnées pour renforcer l'impression de propreté ; de même, dans le domaine alimentaire, les huiles essentielles ont pour objectif de développer les arômes, le plus souvent dans des plats préparés [22].

III.10.2. Utilisation pour leurs propriétés médicinales

L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques, avec les avancées techniques et scientifiques, mené à l'isolation de principes actifs. Il faut alors distinguer phytothérapie et aromathérapie : la phytothérapie est la médecine par les plantes, utilisés en partie ou en totalité, sous différentes formes (teintures mères, extraits fluides ou secs, poudres, infusions, décoctions, ...) ; l'aromathérapie n'utilise que les principes actifs d'une partie de la plante, où ils sont extrêmement concentrés.

Ces deux types de médecines sont complémentaires. Les huiles essentielles sont employées en aromathérapie pour les cas aigus, alors que la phytothérapie est plus adaptée aux cas chroniques [22].

Il n'existe pas de réglementation spécifique aux HE en ce qui concerne leur utilisation dans les médicaments.

Les spécialités pharmaceutiques à base d'HE répondent à la définition du médicament à base de plantes :

« Les médicaments à base de plantes sont des médicaments dont les principes actifs sont exclusivement des drogues végétales et/ou des préparations à base de drogue(s) végétale(s) ».

Par conséquent les médicaments à base d'HE doivent être conformes à la réglementation régissant ces médicaments. En particulier, s'ils satisfont aux critères définis par l'ordonnance n° 2007-613 du 26 avril 2007, ils doivent faire l'objet d'un enregistrement de médicament traditionnel à base de plantes [30].

III.11. Les propriétés médicinales des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. Elles agissent quasiment dans tous les domaines de la santé et de la maladie.

III.11.1. Propriété antiviral

Les virus responsables de certaines pathologies comme le zona, l'herpès, la grippe, le sida sont traité avec succès par certaines huiles essentielles alors qu'à ce jour la médecine chimique se trouve désarmée.

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves se trouvent très nettement améliorées grâce à celle [15].

III.11.2. Propriété antifongique

Ce sont des huiles essentielles pour s'opposer au développement des champignons, des moisissures en les détruisant [15].

III.11.3. Propriété antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites [31].

III.11.4. Propriété antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [31].

III.11.5. Propriété antibactérienne

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par l'antibiorésistance des bactéries, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée in vitro et in vivo [15].

III.11.5.1. Une activité antibactérienne liée à la composition chimique

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique.

Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques l'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques [15].

III.11.5.2. Les actifs antibactériens

Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre d'action sont les phénols: thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation [15].

III.11.5.3. Mode d'action contre les bactéries

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais 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 [15].

III.11.6. Propriété antioxydante

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs.

Chapitre III : Les huiles essentielles

Les antioxydants minimisent efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit [32].

III.12. Les procédés d'extraction

Les propriétés des huiles essentielles sont dépendantes de leur composition biochimique. Il est donc fondamental de les extraire sans en altérer les molécules constitutives, tout en maximisant les rendements d'extraction, compte tenu des faibles concentrations dans la plantes, pour en minimiser le coût [7].

En raison de la diversité et la fragilité des matières premières des huiles essentielles l'extraction de ces dernières exige l'utilisation de moyens peu violents. La pharmacopée française ainsi qu'AFNOR et ISO n'admettent seulement deux entre eux :

- L'entraînement à la vapeur d'eau ;
- L'expression à froid des péricarpes frais de certain *citrus*.

Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés physiques les plus importantes des huiles essentielles.

- Leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau ;
- Leur solubilité dans les solvants organique [33].

III.12.1. La distillation

C'est la méthode la plus connue. Elle consiste à vaporiser partiellement un liquide (eau, solvant organique) qui entrainera avec lui les substances volatiles. Les vapeurs ainsi formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau froide et ensuite récupérées [15].

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales :

III.12.1.1. L'entraînement à la vapeur d'eau (Stream distillation)

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforé à travers de laquelle passe la vapeur d'eau (l'injection de

vapeur se fait à la base de l'alambic) (**Fig III.2**). La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant [7]. On obtient ainsi deux phases non miscibles que l'on peut séparer par décantation : les huiles essentielles et les eaux aromatiques (ou hydrolats) chargées des parties hydrosolubles des essences distillées [15]. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité des huiles essentielles en minimisant des altérations hydrolytiques, et est utilisée pour les plantes fragiles à la chaleur [7].

La distillation se fait lentement sous basse température et basse pression, avec de l'eau de source non chlorée [15].

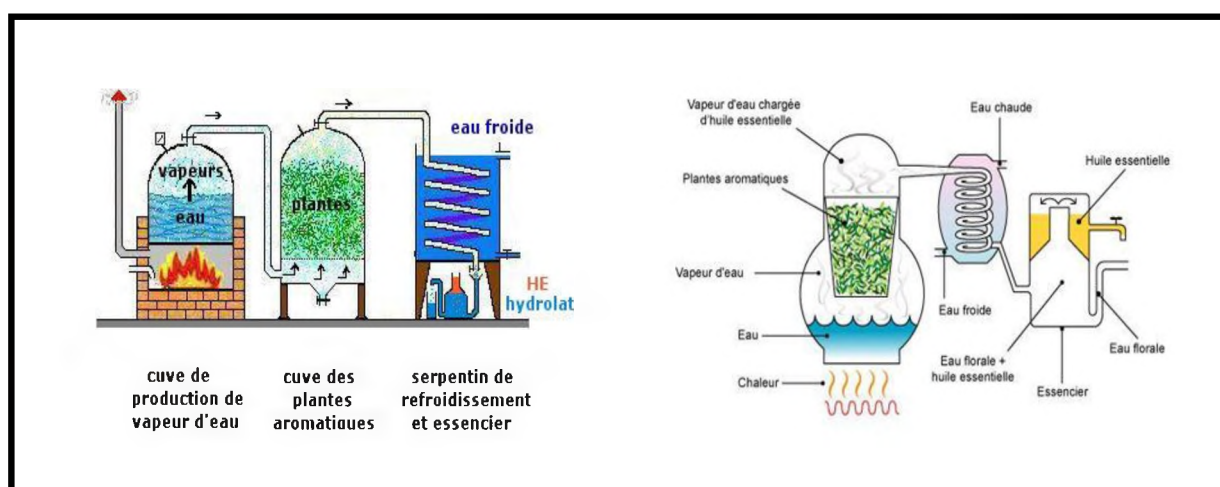


Fig. III.2: Dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau.

III.12.1.2. L'hydrodistillation (Water distillation)

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale directement dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azeotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points

Chapitre III : Les huiles essentielles

d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait [34].

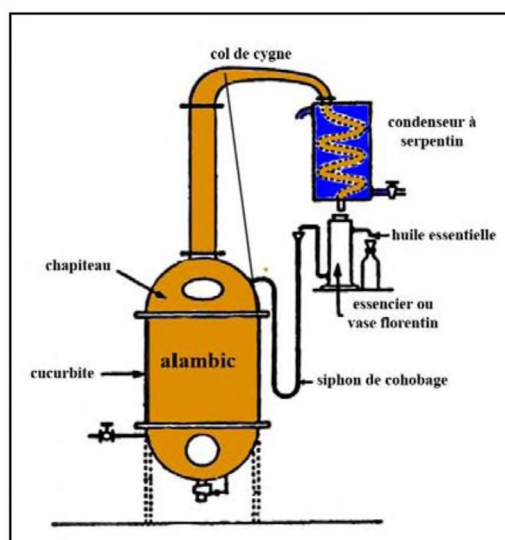


Fig. III.3: Dispositif de l'hydrodistillation.

III.12.1.3. L'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Fig.III.4). Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau

– huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur [43].

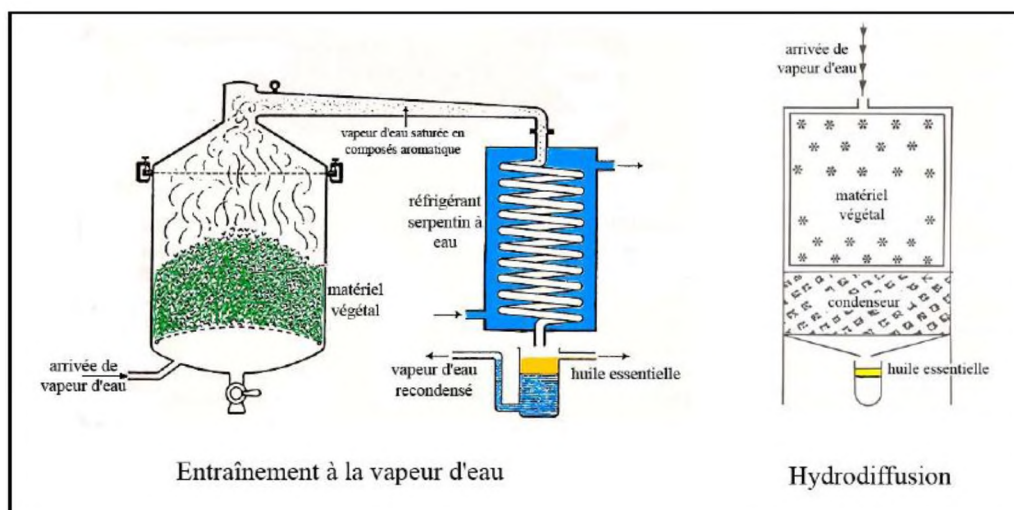


Fig. III.4: Dispositif de l'hydrodiffusion.

III.12.1.4. Extraction par l'expression à froid

Il constitue la plus simple des procédés, mais s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essence [7]. comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau [1].

III.12.2. D'autre procédé d'extraction

III.12.2.1. Extraction par solvants volatils

Cette dénomination est employée dès lors que le solvant n'est pas de l'eau [22]. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles [35].

Chapitre III : Les huiles essentielles

Il est possible d'utiliser des solvants de natures différentes. Mais le solvant choisi doit répondre à de très nombreuses exigences :

- Être non miscible dans l'eau, car le cas contraire rendrait impossible la séparation entre l'eau, le solvant et l'huile essentielle;
- Avoir une température d'ébullition basse afin d'être facilement et rapidement éliminé après l'opération d'extraction, par évaporation sans l'application d'une température élevée qui pourrait altérer la qualité du produit final ;
- Être suffisamment puissant pour dissoudre les molécules responsables du parfum, mais sans extraire les autres molécules inutiles dans la composition du parfum, comme les pigments par exemple ;
- Être liquide à la température et la pression sélectionnées pour l'opération d'extraction, tout en étant ininflammable ;
- Être non réactif avec les composants du produit final ;
- Être peu cher [22].

Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol [35].

Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau [34].

L'inconvénient de cette technique réside dans la nature même de ce procédé. Les solvants employés sont en effet dangereux pour l'homme et/ou pour l'environnement. Ainsi, l'innocuité des produits extraits grâce à cette technique n'étant pas garantie, il est impossible de les utiliser pour des applications alimentaires ou pharmaceutiques. Le benzène, autrefois couramment utilisé, est aujourd'hui interdit en raison de ses effets néfastes pour l'homme. Il est remplacé par l'hexane qui présente néanmoins encore beaucoup de risques [22].

Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation, extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet en sont les principales. (Fig. III.5)

L'extraction par percolation (soxhlet) consiste à faire passer lentement un solvant à travers une cartouche de papier épais et poreux ou une pochette de papier filtre. Elle présente l'avantage de ne pas utiliser beaucoup de solvants. [33]

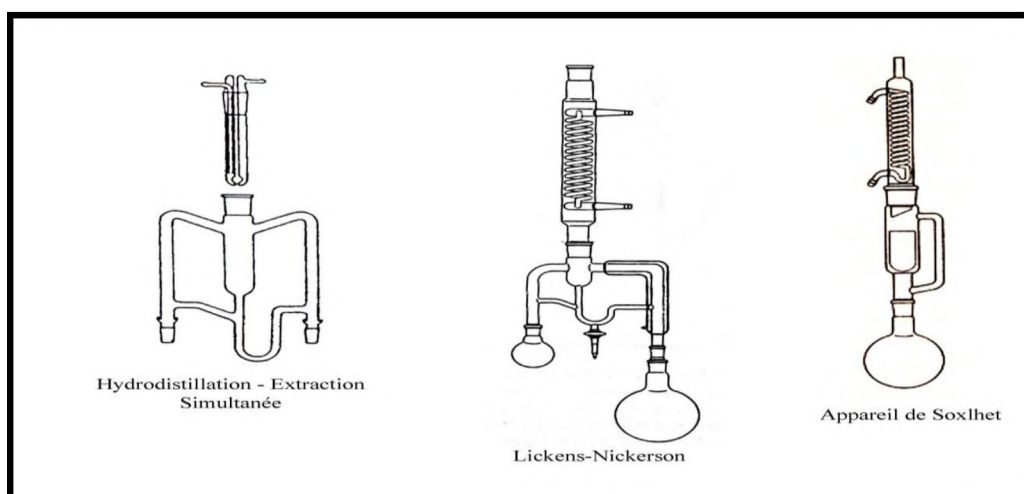


Fig. III.5: Les différents types d'extraction par solvants volatils.

III.12.2.2. Extraction par solvants non volatils (par corps gras ou Macération)

La macération est un procédé d'extraction des huiles essentielles à partir des organes végétaux particulièrement fragiles dont les fleurs, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le jasmin, la violette et la rose.

Le principe de ce procédé est l'épuisement de la matière végétale par les corps gras et se base sur l'affinité des essences vis-à-vis de ce corps gras (ils ont la possibilité d'absorber et de retenir les essences).

Deux méthodes sont employées :

- macération à froid ou enflourage ;
- macération à chaud ou digestion [36].

III.12.2.3. L'enflourage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches à température ambiante sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux) en vue d'une diffusion à froid, au bout de quelques jours la graisse se sature en essence et constitue ce qu'on appelle : pommade florale, celle-ci est épuisée par l'alcool absolu, l'alcool est ensuite évaporé sous vide [33].

Ce procédé est réservé aujourd'hui aux végétaux fragiles comme les fleurs de jasmin, de violette et particulièrement aux essences très volatiles [36].

L'enfleurage n'est pas une technique courante car elle est très coûteuse [28].

III.12.2.4. Digestion

Cette méthode est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys.

La macération à chaud est utilisée pour les plantes moins fragiles telles l'iris et les jonquilles. Pour cela, la graisse est portée à une température de 60° à 70°C [28].

Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) et étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées [37].

III.12.2.5. Extraction au four à micro-ondes

L'échantillon à extraire est introduit directement dans le four et soumis aux micro-ondes. Le chauffage par micro-ondes permet de porter à ébullition en peu de temps l'eau contenue dans la matière, provoquant ainsi l'éclatement des cellules qui libèrent par la suite les composés volatils en dehors du tissu biologique.

L'huile essentielle est entraînée sous forme d'azéotrope vers le condensateur et séparée de l'eau par décantation.

Il existe deux variantes pour ce type de procédé :

- L'hydrodistillation par micro-ondes à pression atmosphérique: elle s'applique essentiellement aux matières végétales à teneur en eau supérieure à 80% ;
- L'hydrodistillation par micro-ondes à pression réduite qui s'effectue avec ou sans ajout d'eau, respectivement aux produits secs ou humides. Ce procédé est appelé VMHD (Vacuum Microwave Hydrodistillation). On réduit la pression du milieu au cours de l'opération.

Ce procédé présente les intérêts suivants :

- Le risque de dégradation thermique de la matière végétale est faible ;
- La qualité n'est pas altérée par l'action hydrolysante de l'eau ;
- Le temps d'extraction est rapide ;
- Le profil aromatique du produit est proche du naturel.

Chapitre III : Les huiles essentielles

Parmi toutes ces techniques d'obtention des huiles essentielles, seule l'hydrodistillation a été retenue. En effet, il s'agit de la méthode la plus utilisée dans les laboratoires et globalement dans le monde pour extraire les essences végétales [28].

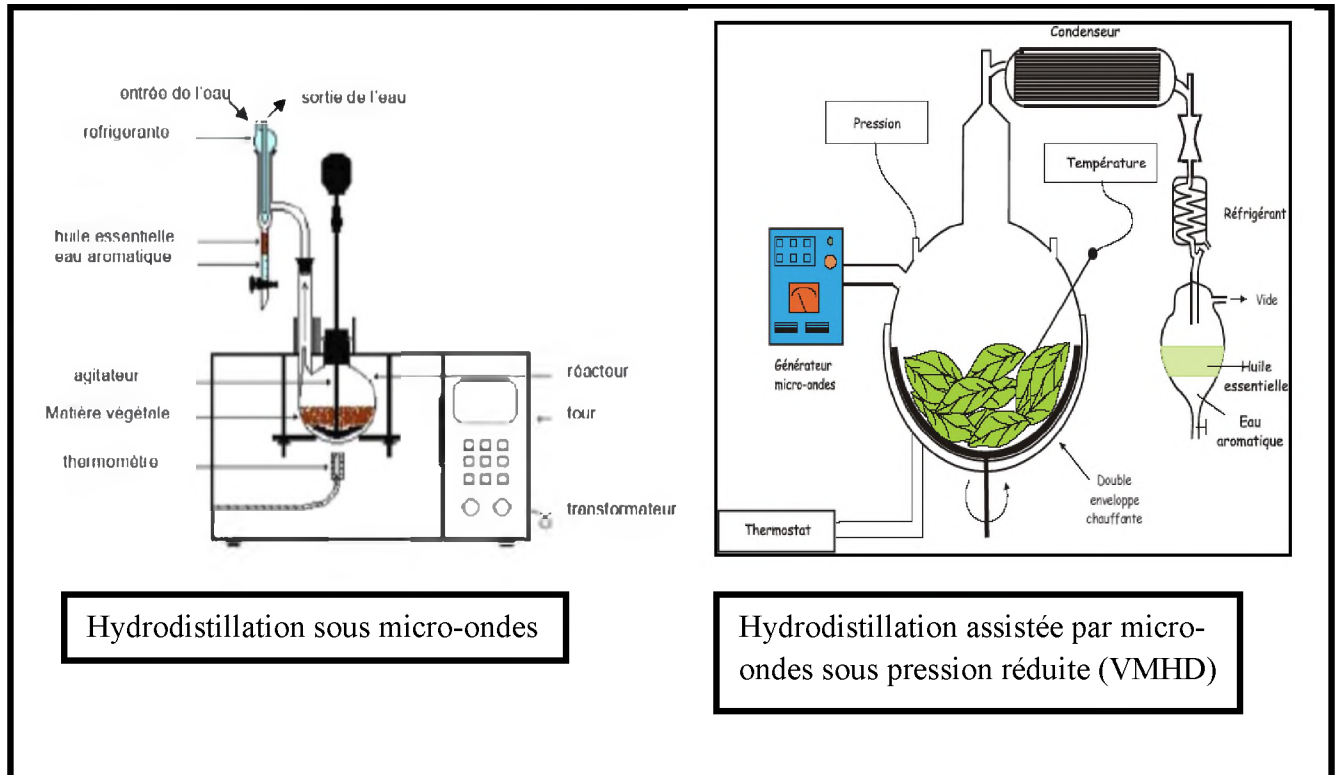


Fig. III.6: Extraction par micro-ondes.

Chapitre IV:

Matériels et méthodes

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1. Démarche expérimentale:

Notre travail a été effectué aux niveaux du laboratoire de :

- Génie des procédés de la faculté des sciences et techniques à l'université de Djilali Bounaama de Khemis Miliana pour réaliser l'extraction de l'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum* par procédé d'hydro-distillation.
- Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger Pour la détermination de la composition chimique de notre HE par CPG.
- Chimie de la faculté des sciences de la nature à l'université de Djilali Bounaama de Khemis Miliana pour l'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle.
- Laboratoire d'analyses médical de Meribai Riad à Ain-Defla pour l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.
- Biochimie de la faculté des sciences de la nature à l'université de Djilali Bounaama de Khemis Miliana pour la détermination des propriétés physico-chimiques.

IV.2. L'extraction de l'huile essentielle de *Petroselinum Sativum*

IV.2.1. La zone d'étude

La plante étudiée (les graines de *Petroselinum Sativum*) achetées, ont été récoltées au niveau de la région d'Ain Berkouk "Miliana" (W.Ain defla)

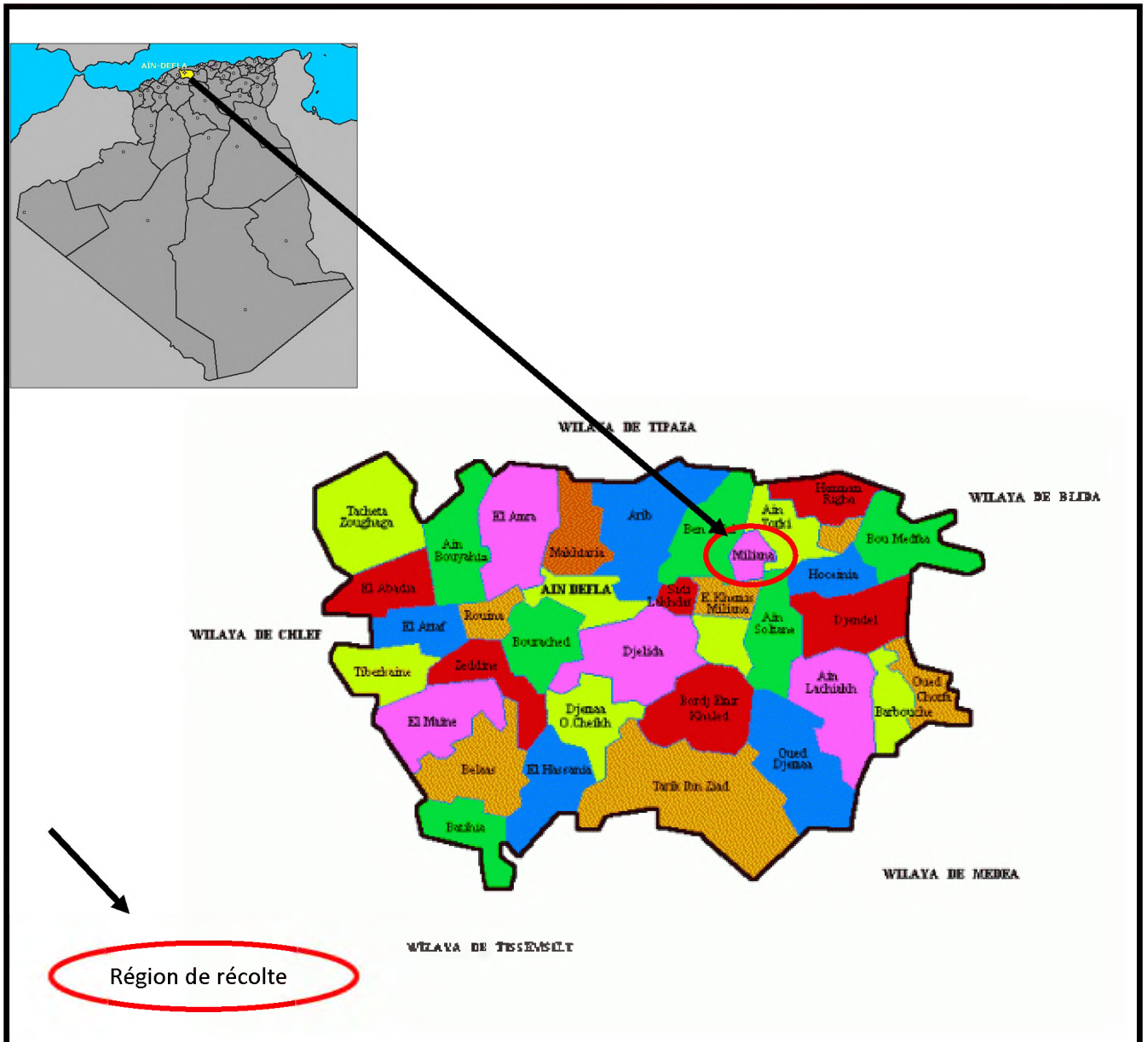


Fig. IV.1: Carte géographique de la région de récolte.

IV.2.2. Matériel végétal

La période de récolte s'étale du mois de septembre jusqu'au mois de octobre 2014, L'extraction de l'huile essentielle est faite à partir des parties aériennes : les graines, à l'état sec à l'air libre et à l'ombre à température ambiante.

Pour soumettre les graines à une série d'analyse il est nécessaire l'éliminer toutes substances étrangères qui sont mêlées avec les graines.

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée à température ambiante par hydrodistillation à partir des graines sèches de persil broyées.

Le broyage de la plante permet d'augmenter la surface de contact eau-matière végétale, une meilleure filtration d'eau au sein de la poudre ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction par l'hydrodistillation.

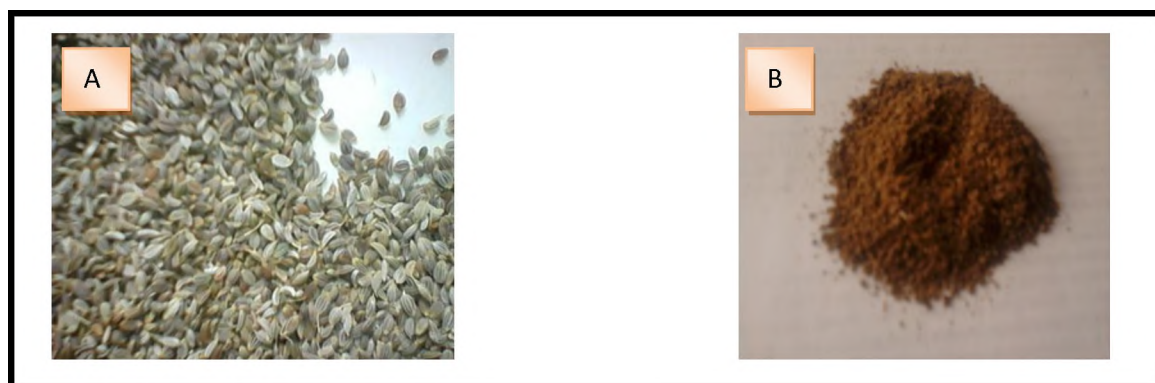


Fig. IV.2 : (A) graines sèches de *Petroselinum Sativum*, (B) graines sèches broyées.

IV.2.3. Extraction de l'HE des fruits de *petroselinum sativum* par hydrodistillation

❖ Mode opératoire

Le matériel végétal séché est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (**Fig. IV.3**). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles.

L'opération consiste à introduire 100 g des graines de *Petroselinum Sativum* broyées dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. Par conséquence les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (**Fig. IV.4**). Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur par le cohobage, ensuite l'huile essentielle est récupérée dans un eppendorf, ayant une couleur jaune et une odeur caractéristique.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

❖ Le montage de l'hydrodistillation (Fig. IV.3) comprend essentiellement les parties suivantes:

1. Ballon : Sert à contenir la matière végétale émergée dans l'eau distillée.
2. La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur.
3. Réfrigérant : C'est un échangeur de chaleur servant à convertir toute vapeur en liquide provenant du ballon (re-condensent les vapeurs).
4. Le vase florentin ou vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale).
5. Cohobe: colonne de recyclage de l'eau aromatique (un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur).
6. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction.

❖ Conditions opératoires de l'extraction des HE par HD :

Quantité des grains broyés (g)	100
Quantité d'eau distillée (ml)	500
Température max (°C)	100
Temps d'hydro-distillation (h)	2 à 3 h

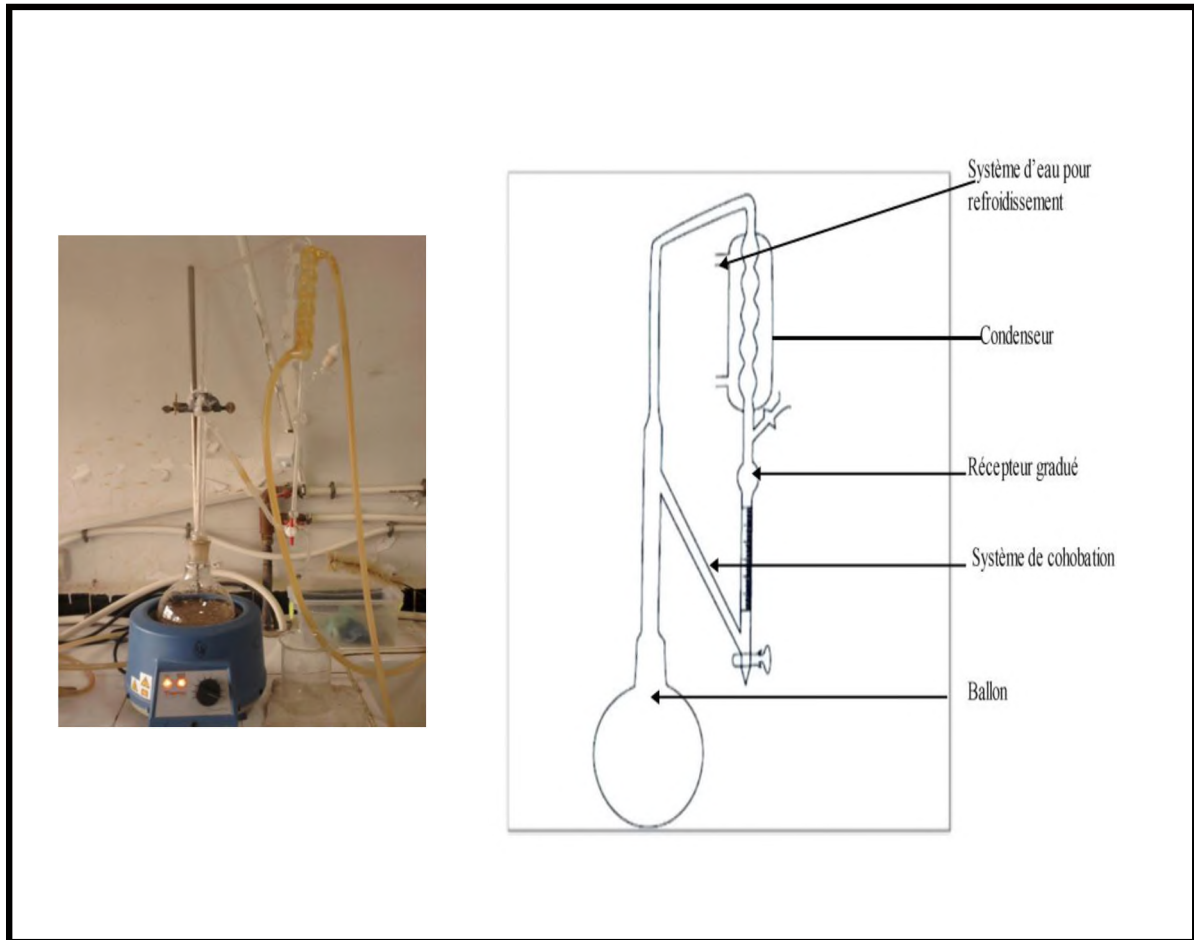


Fig. IV.3: Appareil de Clevenger pour l'hydrodistillation.

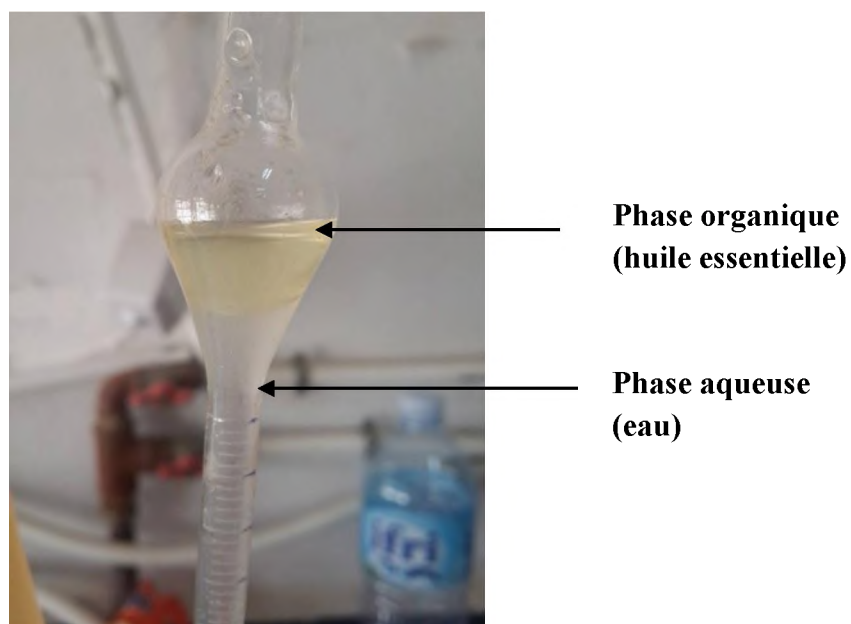


Fig. IV.4: La formation des deux phases.

❖ Le plan d'extraction d'HE est illustré comme suit, (fig. IV.5)

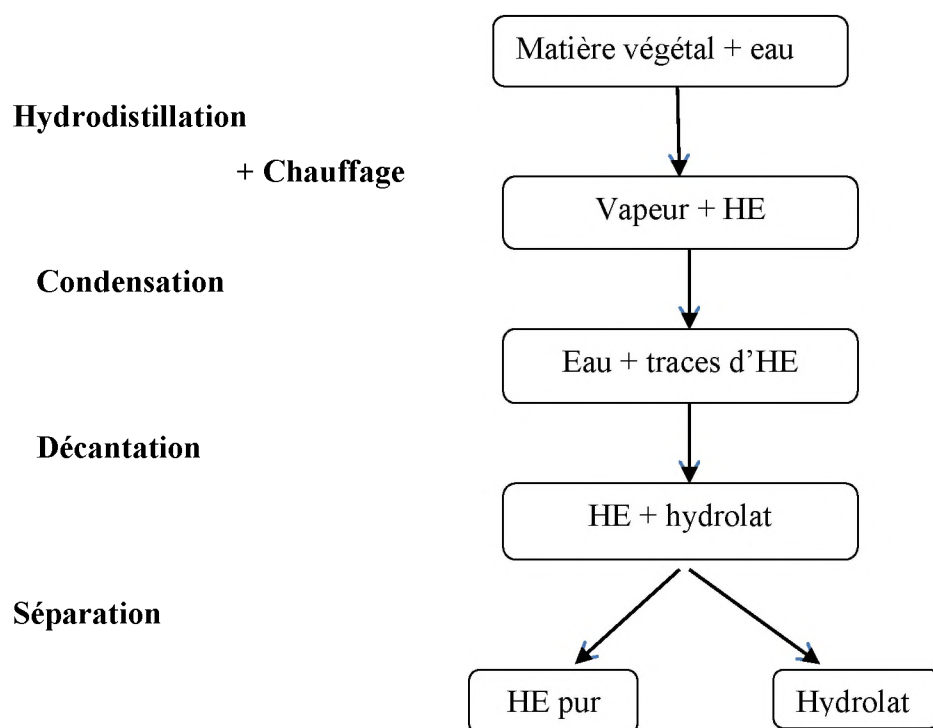


Fig. IV.5 : Les étapes d'extraction d'HE.

IV.3. Conservation d'huile essentielle obtenue

L'huile essentielle extraite est conservée à une température de 4° C, dans des bouteilles, couvertes avec du papier aluminium, fermées hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de températures qui sont les principaux agents de dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

IV.4. Rendement en huile essentielle : [AFNOR, 2000].

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale sèche utilisée. [1, 38]

Le rendement en huiles essentielles est exprimé en pourcentage et donc donné par la relation suivante :

$$\text{RHE (\%)} = (\text{MHE} / \text{MS}) \times 100 \quad (\text{IV.1})$$

Où :

R : Rendement en HE (% m/m)

MHE : Masse d'HE récupérée exprimé en (g) ;

MS : La quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en (g).

IV.5. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des grains de *Petroselinum Sativum* à l'état sec, nous avons effectué plusieurs analyses.

Récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps de 15 mn qui s'étalent de 0 à 180 mn. Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

IV.6. Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles

Pour étudier l'influence de broyage des fruits de *Petroselinum Sativum* sur le rendement en huiles essentielles, nous avons comparé les valeurs des rendements des deux formes (graines broyées et graines non broyées).

IV.7. Caractérisation de l'huile essentielle

Les huiles essentielles, doivent répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des commissions nationales et internationales d'experts.

Selon la norme [AFNOR (1989)], chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques, et ces propriétés physico-chimiques pour connaître la qualité de l'huile essentielle du persil étudiée [39].

IV.7.1. Caractères organoleptiques

Chaque huile essentielle est caractérisée par ses propres caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect et la couleur qui sont décrites par la norme [AFNOR (1989)] [39].

❖ L'odeur

L'odeur est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air [15].

❖ La couleur

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent [15].

❖ L'aspect physique

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide, ou semi-solide [15].

IV.7.2. Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation [AFNOR (1989)] [39].

IV.7.2.1. Les propriétés physiques

❖ pH

Principe

La détermination du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner ; l'une de celles-ci est une électrode sensible aux ions hydrogène (le plus souvent, une électrode de verre) et l'autre une électrode de comparaison (par exemple, une électrode au calomel saturée).

Mode opératoire [40]

Avant de commencer on va étalonner le pH mètre puis on prend 3ml d'huile essentielle de basilic, et on le met dans un flacon ensuite on va plonger la cellule de mesure de pH mètre dans cette huile et en fin on va lire la valeur de ce pH.

Expression des résultats

La valeur de pH est affichée directement sur le pH mètre



Fig. IV.6: le pH mètre.

❖ La densité relative à 20°C

Principe

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un même volume d'eau distillée à 20°C.

Mode opératoire [15]

A l'aide d'une micropipette prélever un volume de 1ml d'huile essentielle étudié et peser ce volume par une balance analytique.

Faire la même chose pour l'eau.

Expression des résultats

La densité relative D_{20} est donnée par la formule suivante :

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (\text{IV.2})$$

Où :

m_2 : La masse en g de tube rempli d'huile essentielle.

m_0 : La masse en g de tube vide.

m_1 : La masse en g de tube rempli d'eau.

❖ L'indice de réfraction

Principe [25]

L'indice de réfraction relie le sinus de l'angle d'incidence à celui de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE

Chapitre IV : Matériels et méthodes

maintenue à une température constante. La valeur affichée correspond à celle de l'indice de réfraction, noté IR

L'indice de réfraction d'une matière, est un nombre qui caractérise le pouvoir qu'a cette matière, à ralentir et à dévier la lumière. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE.

Mode opératoire [15]

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 ou 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principal. Fermer ensuite doucement le prisme secondaire. L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince. Attendre que la température soit stable et effectuer la mesure.

Expression des résultats

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température de chambre puis ramenés à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C}) \quad (\text{IV.3})$$

Où :

I_{20} : Indice à 20°C ;

I_t : Indice à la température de chambre ;

T : Température de mesure.

L'étalon pour réflectométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée avec un indice de réfraction de (1,333) à 20°C. Le résultat est exprimé avec quatre décimales.

Notons que pour un même échantillon, la mesure de la réflectométrie est effectuée trois fois et on prend la moyenne des 3 valeurs.



Fig. IV.7 : Réfractomètre.

IV.7.2.2. Propriétés chimiques

❖ L'indice d'acide

Principe

Il s'agit d'une dissolution de la matière grasse dans de l'éthanol chaud neutralisé, puis titrage des AGL présents au moyen d'une solution titrée de KOH en présence de phénolphtaleine comme indicateur.

Mode opératoire [15]

On pèse 2 g d'HE qu'on introduit dans une fiole ou on ajoute 5 ml d'éthanol à 95%. Agiter et procéder au titrage avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée ($C(\text{KOH}) = 0.1 \text{ mol/l}$), en présence de phénolphtaléine (indicateur coloré), à la température ordinaire (25°C). La couleur jaune clair du liquide (la couleur de l'HE) vire à la neutralisation vers une couleur rose qui persiste quelques minutes avant de reprendre la couleur initiale. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette.

Expression des résultats

L'indice d'acide (IA) est exprimé par la formule :

$$\text{IA} = \frac{5.61 V}{m} \quad (\text{IV.4})$$

Où :

V : Le volume, en ml de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage ;

m : La masse en g de la prise d'essai (exprimer le résultat à une décimale près).

56, 1 g = Masse moléculaire relative de KOH



Fig. IV.8 : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'acide.

❖ L'indice d'ester

Principe

Cette détermination consiste en l'hydrolyse par chauffage des esters présents dans l'HE, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée de KOH, et au dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique (HCl).

Remarque

Il est important de maintenir les réactifs à la température spécifiée de 20°C, notamment la solution éthanolique de KOH, étant donné que le volume des échantillons varie considérablement en fonction de la température

Mode opératoire [15]

2 ± 0,5 g d'HE sont pesés dans un ballon, puis 25 ml de KOH (0,5 N) sont ajoutés ainsi que des pierres ponce. Le ballon est adapté au réfrigérant et l'ensemble est porté à ébullition pendant 60 min, à compter de l'apparition de la première goutte. Après refroidissement, 20 ml d'ED et 5 gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées au mélange. La solution est finalement titrée avec HCl en solution aqueuse 0,5 N sous agitation continue. Au virage de la coloration (solution incolore), le volume V₁ versé est soigneusement noté.

En même temps, il est nécessaire de faire un témoin dans les mêmes conditions. Ainsi, 25 ml de KOH (0,5 N) sont bouillis pendant une heure dans un ballon. Après refroidissement, 20 ml d'ED et 4 à 5 gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées. La solution est ensuite titrée avec HCl (0,5 N). Au virage de la coloration (solution incolore), le volume V₀ versé est noté.

Expression des résultats

L'indice d'ester, **IE** est donné par l'équation ci-après :

$$IE = \frac{28.05}{m} (V_0 - V_1) - IA \quad (IV.5)$$

Où :

V₀ = Volume en ml de HCl 0,5 N utilisé pour l'essai à blanc ;

V₁ = Volume en ml de HCl 0,5 N utilisé pour la prise d'essai ;

m = Masse en g d'huile essentielle ;

IA = Valeur de l'indice d'acide

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Cette formule est valable si et seulement si l'indice d'ester est déterminé indépendamment de l'indice d'acide.

L'indice d'ester est exprimé avec deux chiffres décimaux significatifs s'il est inférieur à 100 et avec trois chiffres décimaux significatifs s'il est supérieur à 100.

IV.8. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle

❖ Analyse chromatographique

La séparation et l'identification des constituants de notre HE ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 μm d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d'un injecteur split splitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote à 1 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de fuite 66 ml/min). La température de la colonne est programmée de 50°C (3min) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10 min.



Fig. IV.9 : Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

IV.9. L'activité biologique

IV.9.1. L'activité antibactérienne

L'objectif de ce travail est de tester notre HE, en déterminant son efficacité bactéricide

Un produit est dit bactéricide lorsqu'il possède la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

L'huile essentielle du persil (*Petroselinum Sativum*) a été testée, à la recherche d'activité inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes et probiotique.

IV.9.1.1. Test de confirmation des souches bactérienne

- Les bactéries pathogènes sont obtenues à partir de prélèvement des malades ayant différentes infections, au niveau de laboratoire d'analyse médical d'Ain Defla.
- Les bactéries probiotiques sont pure obtenu par la laiterie des ARIB.

1-L'identification et l'isolement des bactéries faite par l'observation macroscopique, des bactéries pathogène sur le milieu d'orientation CHROMagar et des bactéries probiotique sur les milieux sélectifs.

➤ Le milieu d'orientation CHROMagar

C'est un milieu non sélectif servant à l'isolement, à l'identification directe, à la différenciation et à l'énumération des agents pathogènes des voies urinaires. Il permet de différencier et d'identifier *Escherichia coli* et *Enterococcus* sans avoir à effectuer de test de confirmation.

2-L'étude des caractères morphologiques sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement 100x pour les bactéries pathogènes et probiotiques. Ils permettent l'observation de mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de Gram.

✚ La coloration de Gram

- Préparer un frottis de la souche test ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95%, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x100

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif [32].



Fig. IV.10 : Microscope.

IV.9.1.2. Préparation de l'inoculum

✓ **préparation de pré-culture**

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (bouillon nutritif). Après incubation pendant 24 heures à 37° C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37° C pendant 18 heures.

✓ Préparation de suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes sur (GN). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, on agite au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm.

Selon **Mac Farland**, on admet une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond a une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml ; la suspension d'inoculum est diluée à 1 :10 dans de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml [32].

IV.9.1.3. Préparation des disques

Les disques sont préparées à partir du papier whatman n° 3 (ou autre type de papier buvard) avec un diamètre de 6 mm, suivant le diamètre de l'emporte-pièce, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 15minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé)

IV.9.1.4. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est Muller-Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

On fait fondre le milieu (M-H) dans une autoclave à 120° pendant 15min et laisser refroidir à 45°C; en suite on verse aseptiquement le milieu dans des boites de pétri (diamètre 90 mm) à raison de 15 ml par boite (4 mm d'épaisseur de gélose), on laisse refroidir et solidifier sur paillasse avant l'emploi.

IV.9.1.5. Etude de l'activité antibactérienne

➤ test « in vitro »

Pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatoگرامme. Cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques [41].

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le micro-organisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Fig. IV.11**).

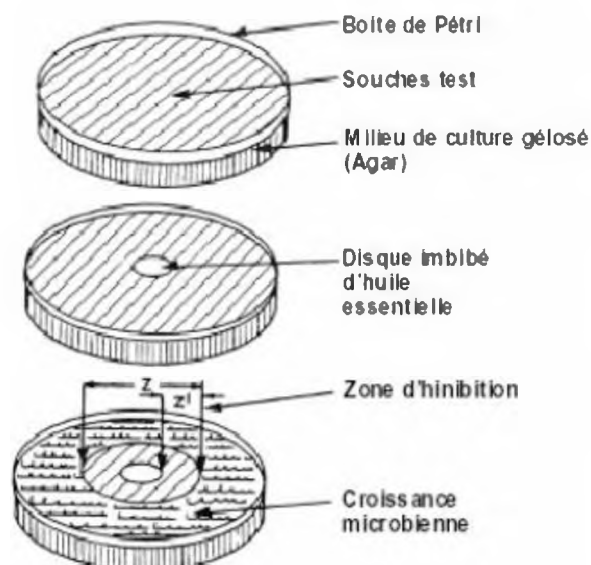


Fig. IV.11 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.

➤ **Protocole expérimental (aromatogramme des souches)**

A. L'ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois [42].

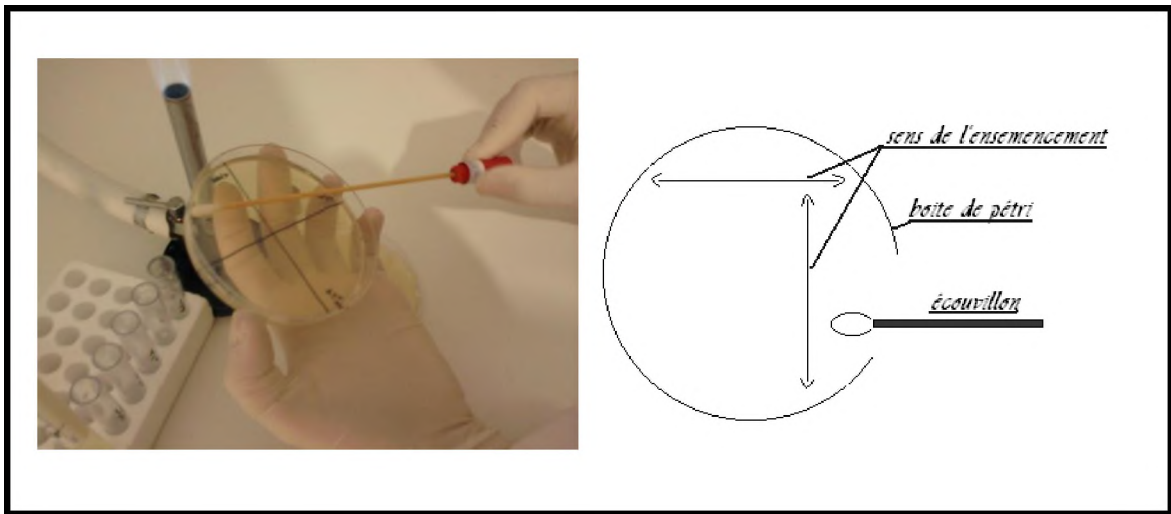


Fig. IV.12: Ensemencement par écouvillon.

B. Dépôt de disque :

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques sur une boîte de 90 mm.

A l'aide d'une pince stérile, on prélève à chaque fois un disque stérile, et on l'imbibe avec l'huile essentielle en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'huile essentielle, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque, on les dépose sur la surface de la gélose.

On laisse diffuser les boîtes de pétri sur paillasse pendant 30 minutes, puis on incube à 37°C pendant 24 heures.

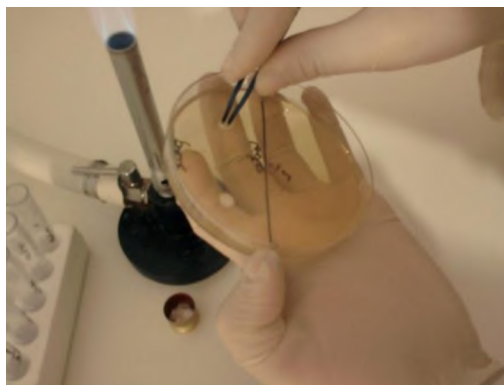


Fig. IV.13: Dépôt de disque.

Remarque

- Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose.
- Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte.

C- La lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, ou des halos clairs tout autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs.

L'inhibition est noté positive si le diamètre est supérieur à 2 mm [7].

IV.9.1.6. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

Les zones d'inhibition obtenues ne sont pas représentatives dans le cas des huiles qui ne diffusent pas bien dans le milieu de culture, malgré leur dissolution dans un solvant organique, et par conséquent le calcul des diamètres d'inhibition seront erroné.

Pour cela, la recherche de l'activité antibactérienne avec cette méthode est insuffisante, il faut cependant utiliser la méthode de "détermination de la concentration minimale inhibitrice", pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles.

❖ Déterminations de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Nous avons déterminé la CMI pour l'HE du persil qui présente une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae*.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90% ; donc ne laisse survivre que 10% de la population (aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

Chapitre IV : Matériels et méthodes

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des HEs dans des milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin : éthanol, méthanol, acétone en combinaison avec Tween-80, Tween-20, DMSO, propylène-glycol, Tween-80, et l'agar [32].

✓ Préparation de la gamme de dilutions

Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 500 à 0,97 $\mu\text{l/ml}$ (voire tableau..).

✓ Diffusion sur milieu gélosé

Par la même manière que la précédente

Tableau. IV.1 : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution (HE/éthanol)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
$\mu\text{l HE/ml}$	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97

IV.9.2. L'activité antioxydante

Actuellement une grande diversité des méthodes analytiques est disponible pour la détermination de la capacité antioxydante. Dans notre étude, l'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par deux méthodes : le test de la réduction du radical libre du DPPH et le test de réduction du fer (FRAP).

IV.9.2.1. Test au DPPH

Principe

Le 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Le test au *DPPH*[•] permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI_{50} des substances antioxydantes contenues dans un extrait.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IC_{50} Ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC_{50} pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°.

Ce radical libre possède une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit par un antioxydant (composé à propriété antiradicalaire) en diphenyle picryl hydrazine, sa coloration devient jaune pâle. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la forme libre en solution dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire.

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où:

(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyle picrylhydrazine (jaune).

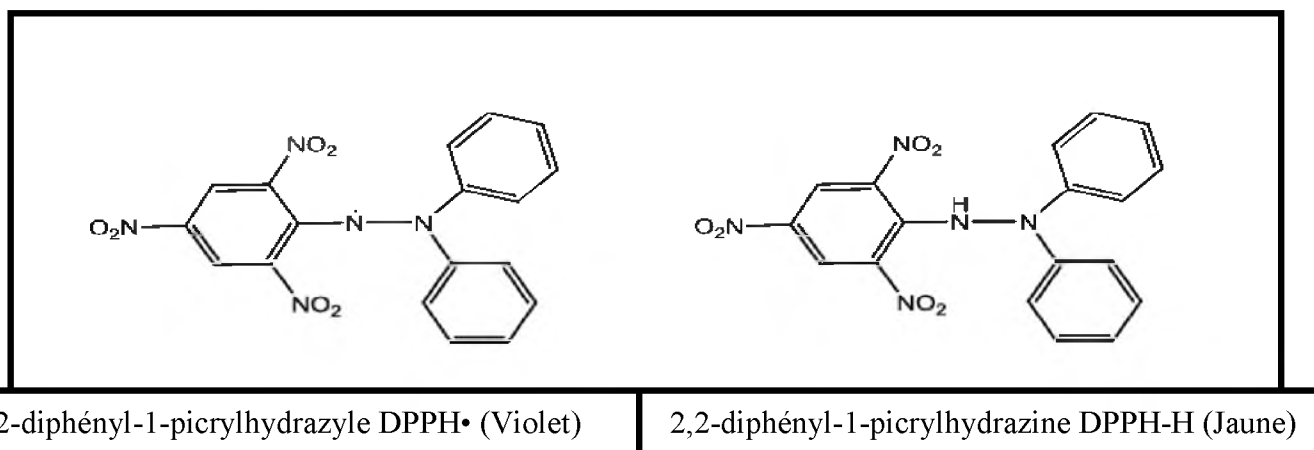


Fig. IV.14 : Forme libre et réduite du DPPH.

Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, M : 394,33), est solubilisé dans du méthanol.

Trois milligrammes de DPPH sont pesés à l'aide d'une balance de précision et solubilisés ensuite dans 100 ml de (méthanol ou éthanol) pour avoir une concentration finale de 0,003%.

Mode opératoire [28]

Dans des tubes secs et stériles, 1ml des solutions méthanoïques de l'huile essentielle testées à différentes concentrations (1000, 800, 600, 400, 200, 100µg/ml) sont mélangées avec 1ml d'une solution méthanoïque de DPPH (0,003%).

Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité (incubation), à température ambiante pendant 30 min, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. En outre, un contrôle négatif constitué de 1 ml de la solution méthanoïque au DPPH 0,003% et de 1ml de méthanol doit être réalisé. La densité optique (DO) est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**fig. IV.15**).

On détermine les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour HE. (% I, IC50). Tous les essais ont été effectués en triple.

Expression des résultats

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire (AA %) ou par l'inhibition des radicaux libres en pourcentage (I %) en utilisant la formule suivante :



Fig. IV.15: Spectrophotomètre.

$$AA (\%) = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\} \quad (\text{IV.7})$$

Ou encore :

$$I (\%) = \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}})}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right\} * 100 \quad (\text{IV.8})$$

Soit:

AA: Activité antioxydante ;

I (%) : Pourcentage d'inhibition en % ;

Abs échantillon : Absorbance du test effectué ;

Abs contrôle : Absorbance du contrôle négatif (solution témoin, à blanc)

Calcul des IC_{50} [43]

Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

IV.9.2.2. Test de réduction de fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Principe [44]

La test de FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), est un exemple pour mesurer la capacité antioxydante, elle est basée sur le transfert d'un électron. Cette technique a été développée par Benzie et son collègue Strain pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, ensuite le test a été généralisé aux études des pouvoirs antioxydants des extraits de plantes. Cette technique consiste à réduire le complexe 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron. La variation de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 593 nm. Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur.

La réduction de Fe(III) en Fe(II) exprime la capacité antioxydante dans le test de FRAP. Cependant, les échantillons à tester peuvent contenir du Fe(III)

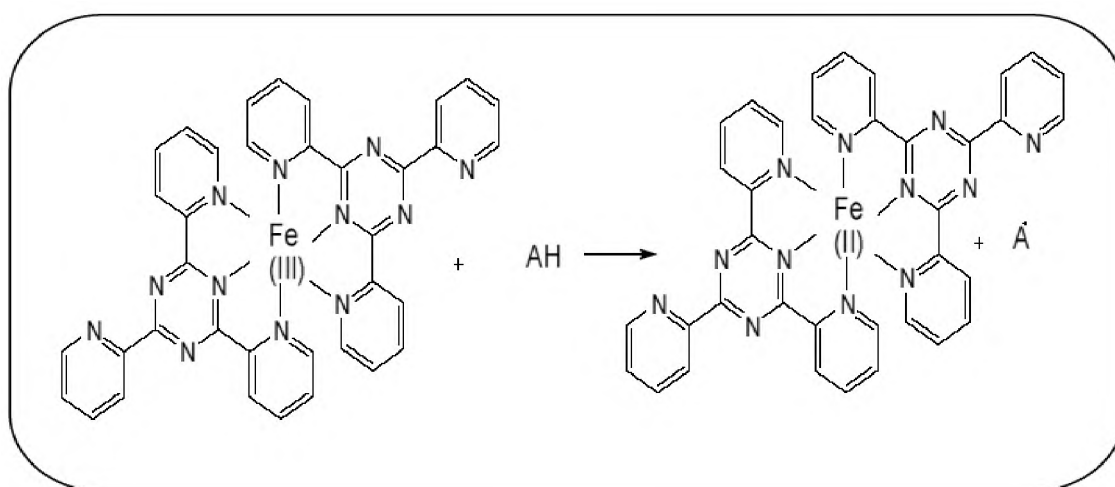


Fig. IV.16: Mécanisme réactionnel du test de FRAP

Mode opératoire [45]

L'activité réductrice du fer de nos extraits est basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+}

1 ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%.

L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite ; 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ; 2,5ml du surnageant sont mélangés avec 1.5ml d'eau distillée et 150 μl d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Chapitre V:

Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus lors de cette étude, suivies d'une discussion pour chaque étape étudiée.

V.1. Rendement en huiles essentielles

L'étude de l'activité antibactérienne, antioxydante et la détermination des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Petroselinum Sativum* nécessite une quantité élevée d'huile. Ceci nous a amené à faire plusieurs extractions conduites sur un certain temps pour arriver à la quantité voulue.

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors de l'extraction de l'HE des graines sèche par hydrodistillation durant (3 heures) varient entre **1,8%** et **2,1%**

Ce résultat est raisonnable puisqu'il se rapproche à celle obtenu par la littérature, cette différence de rendement entre la théorie et le pratique est due à divers facteurs et principalement le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement, l'interaction avec l'environnement (la nature du sol ou climat), l'organe de la plante utilisé, la période de séchage, l'origine de la plante, la méthode et le matériel employé pour l'extraction, ... etc.

Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en huiles essentielles.

V.2. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

D'après la formule du RHE (%), l'évolution du rendement en fonction du temps est donnée dans le **(tableau V.1)** et représentée par la **(figure V.1)**

Chapitre V : Résultats et discussion

Tableau. V.1 : Evolution du rendement d'extraction des HE des graines de persil par HD en fonction du temps.

Temps (min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
RHE %	0	0	0,3	0,5	0,9	1	1,2	1,4	1,7	1,8	1,9	2	2	2,02	2,04	2,05

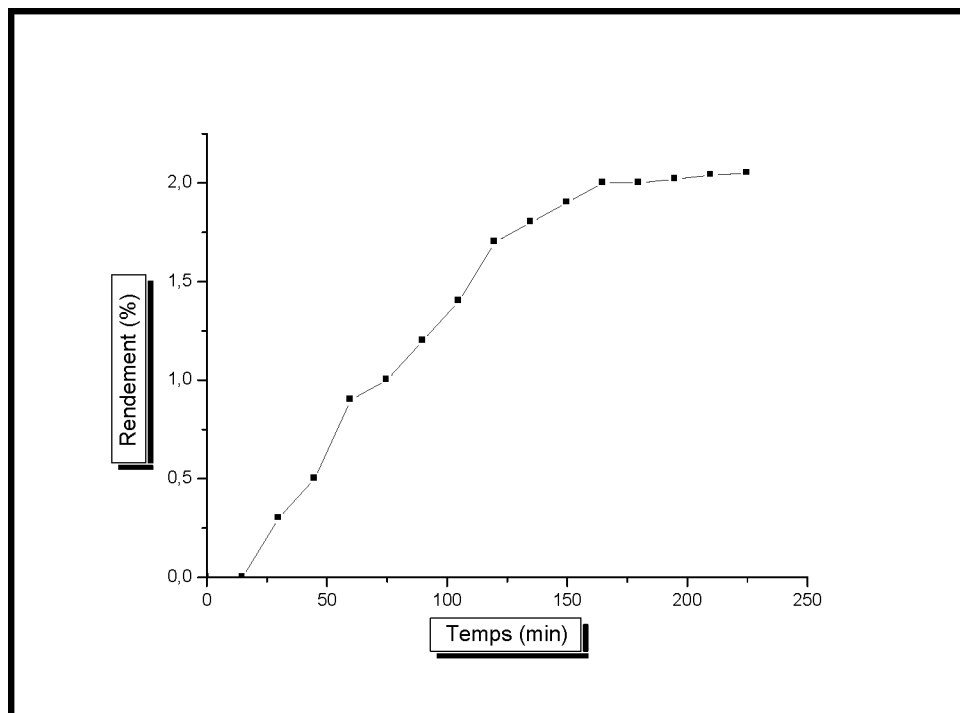


Fig. V.1: Cinétique d'extraction d'huile de persil.

• Interprétation du graphe :

La cinétique se divise en trois étapes :

- Dans la première, nous observons un palier pour un rendement nul, correspondant à la phase de chauffage de la matrice.
- La seconde correspond à un saut marqué de la quantité d'HE récupérée (30-150 min).
- Enfin, au cours de la troisième étape, la courbe tend vers un second palier qui correspond au rendement maximum possible à atteindre.

Chapitre V : Résultats et discussion

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

La cinétique d'extraction de l'HE des graines de *Petroselinum Sativum*, indique que le rendement augmente en fonction du temps puis il se stabilise.

Les résultats présentés dans le **(tableau V.1)** et la **(figure V.1)** montrent que pour une durée de traitement de 180 min, nous avons pu atteindre le palier traduisant la fin de l'extraction, de ce fait nous pouvons dire que l'essentiel de l'HE est extrait lors des 3 premières heures de traitement, et il ne serait économiquement pas avantageux de prolonger l'extraction dans ces conditions au-delà de 3 heures.

V.3. Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles

Les résultats obtenus sont consignés dans le **(tableau V.2)**:

Tableau V.2: Comparaison du rendement en huiles essentielles à partir des graines sèches non broyées et celui obtenue à partir des graines sèches broyées.

Graines de <i>Petroselinum Sativum</i>	Broyées	Non broyées
La masse (g)	100	100
Le rendement en huiles essentielles en (%)	2,1	0,8

D'après les résultats du **(tableau V.2)**, nous constatons que les fruits du persil broyés donnent un meilleur rendement en huiles essentielles que les fruits non broyés. Cela est dû à l'augmentation de la surface de contact eau-matière végétale lorsque les graines sont broyées, une meilleure filtration d'eau au sein de la poudre ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction par hydrodistillation.

V.4. Caractérisation de l'huile essentielle

La caractérisation (propriétés physico-chimique, organoleptique) constitue un moyen de contrôle de notre l'HE. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par [AFNOR (1989)].

Les valeurs de références de la densité et de l'indice de réfraction sont des indices de pureté. Tandis que les indices d'acide et d'ester sont variables en fonction de taux d'altération des huiles essentielles, donc ce sont des indices de qualité.

V.4.1. Propriétés organoleptique

Les caractéristiques organoleptiques des HE extraites à partir des graines de *Petroselinum Sativum* sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau V.3 : Les caractéristiques organoleptiques de l'HE des graines de *Petroselinum Sativum*.

Caractéristiques organoleptiques	Résultats trouvés	Norme AFNOR (1989)
Aspect physique	Liquide limpide	Liquide limpide pouvant parfois cristalliser
Couleur	Jaune clair presque incolore	Presque incolore à jaune ambré (brunâtre)
Odeur	Odeur caractéristique épicée du fruit écrasé	Caractéristique du fruit écrasé, mais différente de celle de la partie verte de la plante
Saveur	Très forte	/

Chapitre V : Résultats et discussion

L'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum* a un aspect liquide et limpide ainsi qu'une odeur caractéristique et une couleur jaune clair (**fig V.2**).



Fig V.2 : HE de persil extrait.

V.4.2. Les propriétés physico-chimiques

Le tableau montre les résultats des propriétés physico-chimiques, en comparaison avec les valeurs de référence.

Tableau V.4 : Les caractéristiques physico-chimiques d'HE de *Petroselinum Sativum*

Caractéristiques physico-chimiques	Résultats trouvés	Norme [AFNOR (1989)] [39]
pH	4,8	4 - 6
Densité à (20°C)	1,056	[1,043 – 1,083]
L'indice de réfraction (IR)	1,5170	[1,5100 – 1,5220]
L'indice d'acide (IA)	4,0275	Maximum 6
L'indice d'ester (IE)	5,531	Maximum 11

V.4.2.1. Les caractéristiques physiques

❖ Le pH

Le pH indique que notre huile extraite est acide. Ce résultat est conforme à la norme AFNOR. Cette conformité est due à la pureté de notre l'huile (bien séparé de l'eau).

❖ La densité

C'est l'un des critères de pureté, d'après les résultats obtenus, la densité de notre huile essentielle est de 1.056, donc elle est plus dense que l'eau. Ce résultat est conforme à la norme AFNOR (1989).

❖ L'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'HE de *Petroselinum Sativum* est 1,5170, cette valeur est conforme à la norme AFNOR.

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Plus l'indice de réfraction est faible, plus le composé est pur, donc plus qu'il est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande.

V.4.2.2. Les caractéristiques chimiques

❖ L'indice d'acide

Le résultat de l'indice d'acide obtenu est de 4,0275, il est conforme à la norme AFNOR (1989).

C'est un paramètre qui renseigne sur le taux d'acides libres existant dans un l'huile essentielle, ce paramètre peut nous aider à savoir la qualité de notre produit.

L'indice d'acide de notre HE est faible, ce qui prouve que notre huile essentielle est stable et ne provoque pas d'oxydation inquiétante, car l'huile essentielle en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide.

Un produit à un indice d'acidité très fort est un produit de faible qualité, c.à.d. qu'il présente une forte concentration en acide gras libres, facilement dégradable « hydrolyse des esters » durant sa conservation, ce qui est à terme préjudiciable. Inversement, un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). En réalité, une huile essentielle fraîche contient très peu d'acides libres.

❖ L'indice d'ester

La valeur d'indice d'ester obtenu est de 5,531 .cette valeur est conforme à la norme AFNOR.

Chapitre V : Résultats et discussion

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

V.5. Analyse chromatographique

Les résultats de l'analyse quantitative et qualitative des HE de *Petroselinum Sativum* sont représentés dans le (tableau V.5) et par la (figure V.3).

Tableau V.5 : Composition chimique des HE de *Petroselinum Sativum*.

Principaux Composés en % de l'huile essentielle de Grains de Persil			
Nom des composés	Pic N°	Tr (min)	Région : Ain-Defla
a-thujène	01	13,54	0,17 %
α-pinène	02	14,17	19,11 %
Camphène	03	14,79	0,13 %
β-pinène	04	16,77	13,98 %
Myrcène	05	17,52	0,79 %
Carène	06	18,34	0,19 %
Limonène	07	20,17	4,66 %
Gamma-terpinène	08	22,12	0,24 %
Linalol	09	25,08	0,03 %
Bornéol	10	31,20	0,05 %
Alpha.Terpéneol	11	31,94	0,58 %
Elemicine	12	54,53	11,62 %
Myristicine	13	59,43	23,71 %
Apiol	14	64,46	20,47 %

Chapitre V : Résultats et discussion

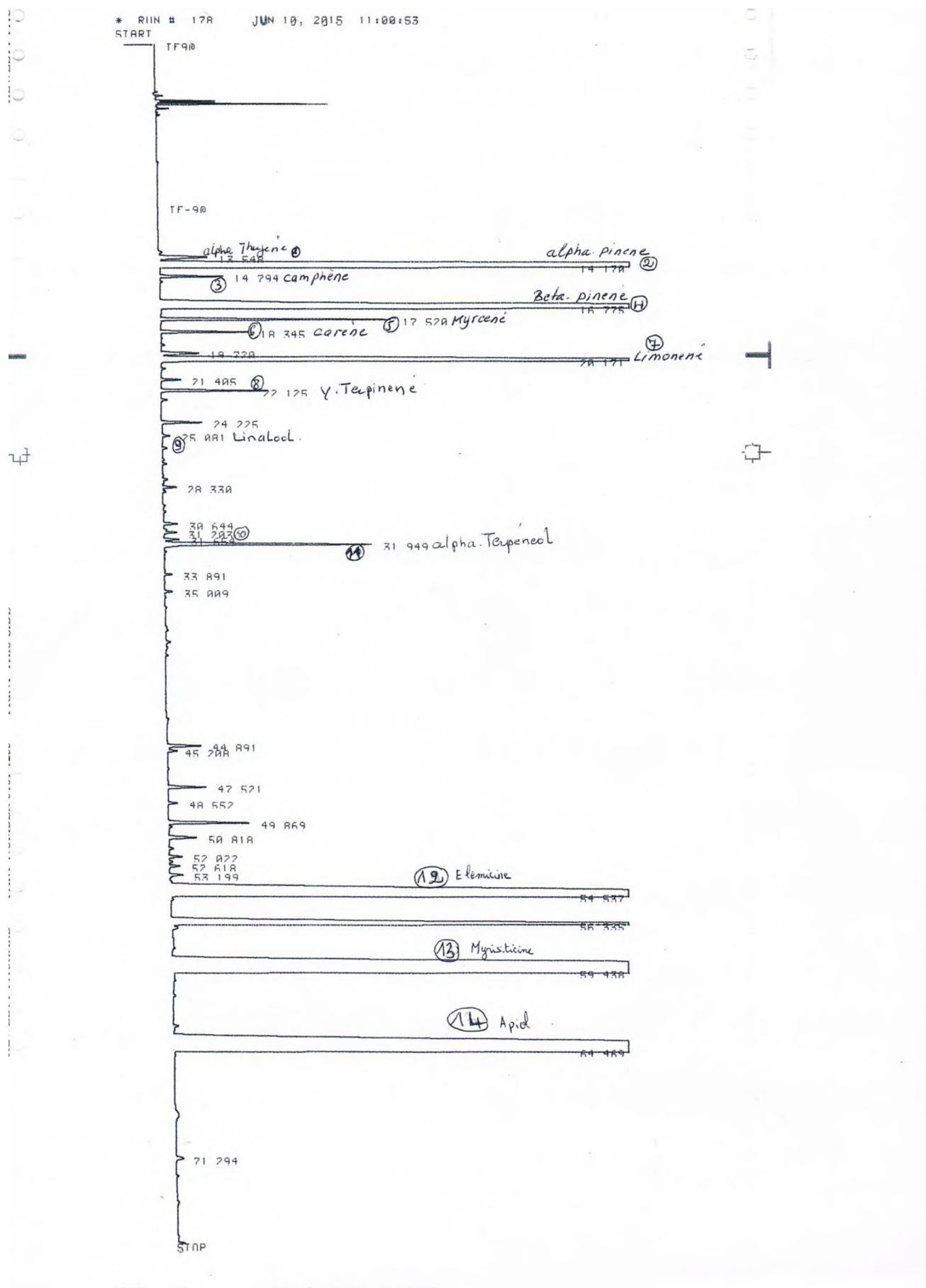


Fig V.3: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Petroselinum Sativum*.

L'analyse quantitative et qualitative de l'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum* avait pour objectif la détermination de la teneur des composants chimiques et leur identité.

Notre huile de Persil est très riche en Myristicine (23,71 %) ce qui signifie qu'il s'agit du composé majoritaire. Le chromatogramme (**Fig V.3**) démontre aussi l'importance d'Apiol (20,47 %), α -pinène (19,11 %), β -pinène (13,98 %) et Elimicine (11,62 %). Limonène est présenté avec une teneur appréciable dans HE de *Petroselinum Sativum* (4,66 %).

Donc il faut noter que notre espèce de Persil est dominée par le Myristicine.

V.6. L'activité antibactérienne

V.6.1. Test de confirmation des souches bactérienne

V.6.1.1. Etude morphologique

✚ Examen macroscopique

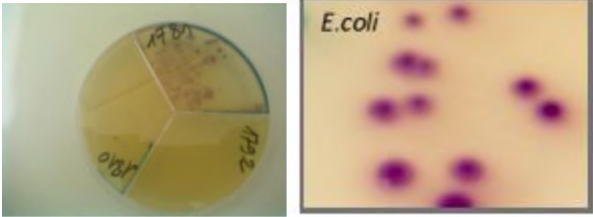
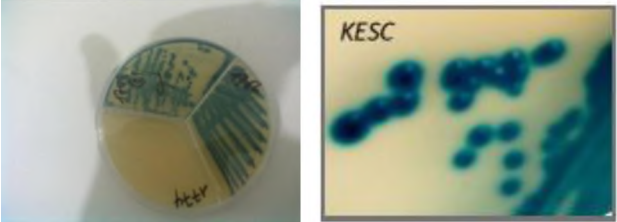
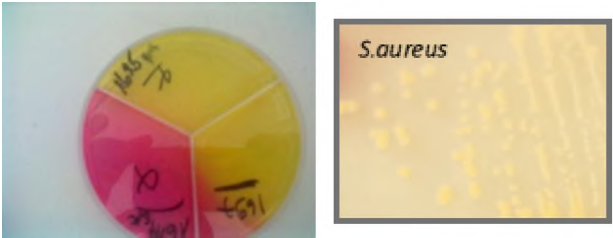
Examen macroscopique a permis d'évaluer les différents caractères cultureux (la couleur des colonies, leurs formes, la taille et la consistance)

Chapitre V : Résultats et discussion

➤ Les bactéries pathogènes [27]

L'aspect macroscopique des colonies des souches pathogènes étudiées sur le milieu d'orientation CHROMagar est consigné dans le tableau suivant :

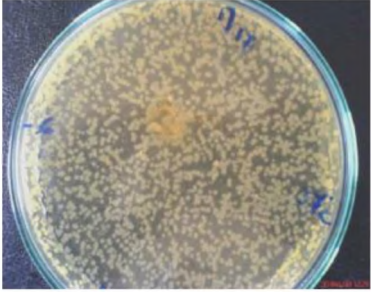
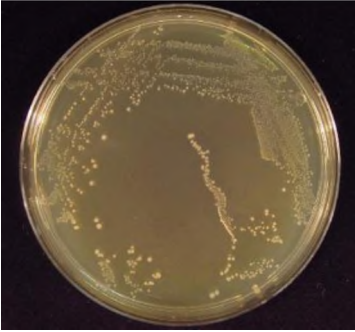
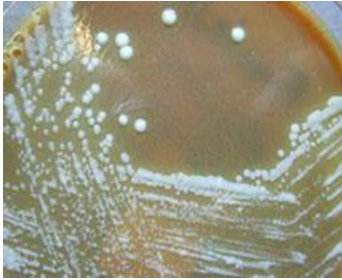
Tableau V.6 : L'aspect typique des souches pathogènes sur le milieu CHROMagar

Les souches pathogènes	Aspect typique des colonies
<p>E.coli</p> 	<p>Roses foncées à rougeâtres</p>
<p>Klebsiella</p> 	<p>Bleues métalliques</p>
<p>Staphylococcus aureus</p> 	<p>Dorées, opaques, petites</p>

➤ Les bactéries probiotiques

L'aspect macroscopique des colonies des souches probiotiques étudiées sur des milieux sélectifs est consigné dans le tableau suivant :

Tableau V.7 : L'aspect typique des souches probiotiques sur milieux sélectif.

Les souches probiotiques	Aspect typiques des colonies
<p>Culture de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> sur le milieu MRS agar.</p> 	<p>Petites colonies identiques de couleur blanche crème</p>
<p>Culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> sur le milieu M17 agar.</p> 	<p>Colonies rondes ou lenticulaires de petite taille et de couleur blanche crème Avec un diamètre entre 0.5 à 1.5mm, déposé en paires, en tétrade et en chaîne.</p>
<p>Culture de <i>Lactococcus lactis</i> sur le milieu M17 agar</p> 	<p>Colonies rondes blanchâtres</p>


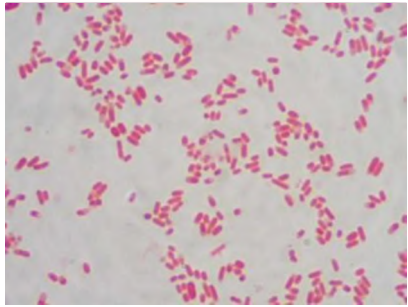
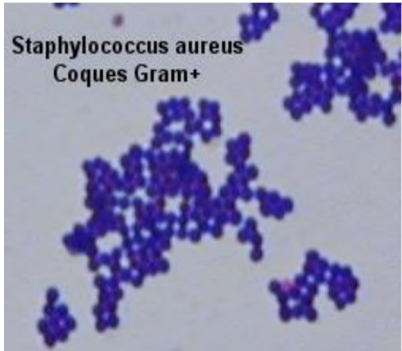
Examen microscopique

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram. Permis d'observer les différentes formes des bactéries isolées, en se basant sur le fait que les souches retenant le colorant « violet de Gentiane » sont Gram positives, tandis que celles acquérant une couleur rosâtre appartiendraient au groupe des Gram négatives. L'examen révéla en outre, la forme (coques ou bacilles) ainsi que le mode d'association des souches étudiées.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans les 2 tableaux suivants :

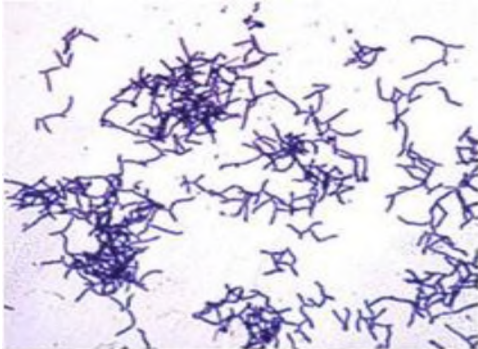
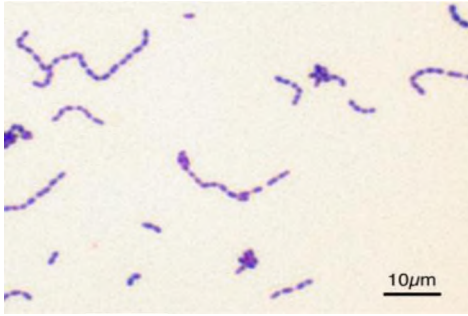

➤ Les bactéries pathogènes

Tableau V.8 : Coloration de Gram des souches pathogènes

Les souches	Vue microscopique
Escherichia coli Egalement appelée « colibacille », bacille à Gram négatif, mobiles, aéro-anaérobie	
klebsiella pneumoniae Bacille immobile (forme bâtonnet), aéro-anaérobie, à Gram négatif, et généralement encapsulées	
Staphylococcus aureus Ce sont des coques Gram positif arrondis d'environ 1µm de diamètre, immobiles, dépourvus de spores et de capsules, aéro-anaérobie.	

➤ Les bactéries probiotiques

Tableau V.9 : Coloration de Gram des souches probiotiques.

Les souches	Vue microscopique
Lactobacillus bulgaricus Sous forme bacille, à Gram positive	
Streptococcus thermophilus sous forme de cocci en chaînette (coque arrondie), de 0,7-1 µm, formant des chaînes ou des paires à Gram positive	
Lactococcus lactis Ou lactocoque lactique, bactérie à Gram positif, non mobile, non sporulante,	

V.6.2. Réactivation des souches

Après repiquage des souches dans un bouillon nutritif, la croissance des bactéries après 24 heures d'incubation à 37°C se manifeste par l'apparition de trouble.

V.6.3. Aromatogramme des souches

L'activité antibactérienne des HE de *Petroselinum Sativum* sur les souches probiotiques et pathogènes s'est traduite par l'apparition de zone d'inhibition autour des disques, d'un diamètre variable selon la souche.

Les résultats du test de sensibilité bactérienne à HE de persil sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau V.10 : Détermination des zones d'inhibitions des HEs des graines de persil vis-à-vis des bactéries pathogènes et probiotiques.

Les souches bactériennes	Diamètre d'inhibition (mm)
Escherichia coli	/
klebsiella pneumoniae	13
Staphylococcus aureus	10
Lactobacillus bulgaricus	/
Streptococcus thermophilus	/
Lactococcus lactis	/

D'après les résultats obtenus nous avons constatés que l'HE pure de *Petroselinum Sativum* avait exercée une activité inhibitrice vis-à-vis les souches pathogènes, notamment *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram positif) et *klebsiella pneumonia* (bactérie Gram négatif). Donc c'est deux souches sont sensible envers l'huile de persil.

L'activité antibactérienne des HE peut être expliquée par l'effet synergique entre les composés d'HE. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne de cette HE. En tant que constituants majoritaires, le myristicin et l'apiol auraient être considéré comme les responsables du pouvoir antibactérienne d'HE de persil. Ces composés inhibés le développement des bactéries pathogènes.

Chapitre V : Résultats et discussion

L'activité antibactérienne d'HE de persil sur *E. coli* est faible, elle présente une certaine résistance.

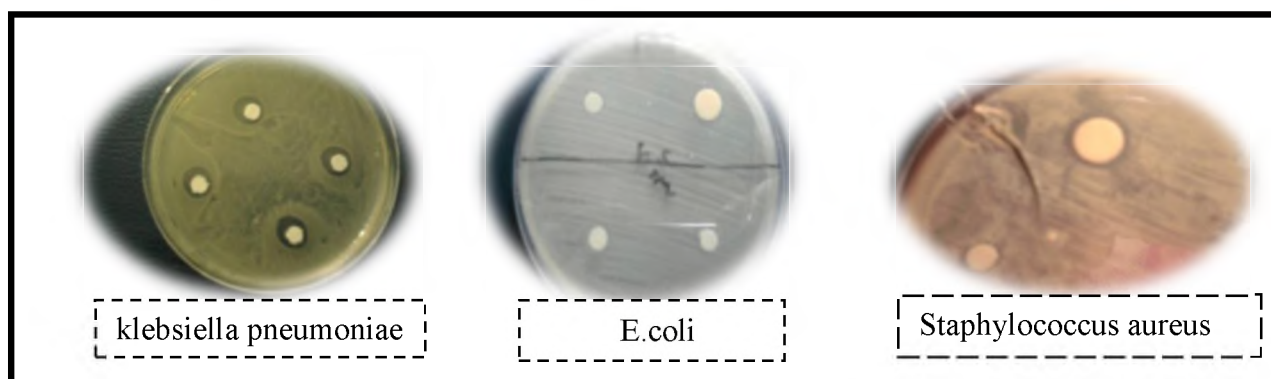


Fig V.4 : Des zones d'inhibitions des HEs des graines de persil vis-à-vis des bactéries pathogènes.

D'autre part, l'HE de *Petroselinum Sativum* n'avait démontré aucune activité inhibitrice vis-à-vis toutes les bactéries probiotiques. Cela pourrait s'expliquer par les sécrétions acides résultantes de leur métabolisme fermentaire et en particulier l'acide lactique qui ont affaibli l'efficacité antibactérienne de notre HE.

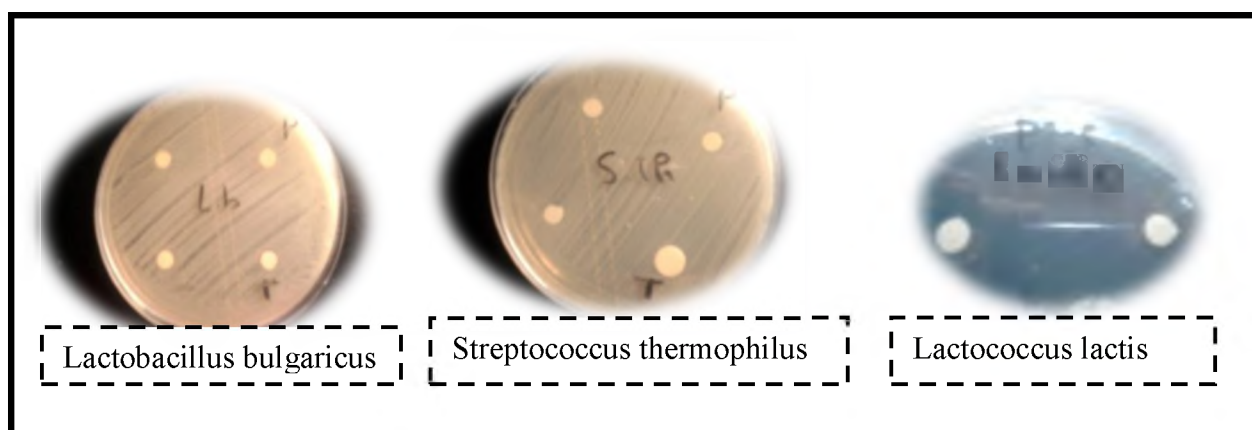


Fig V.5 : Des zones d'inhibitions des HEs des graines de persil vis-à-vis des bactéries probiotiques

V.6.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Les valeurs de CMI étaient variables selon le type d'huile essentielle et la souche visée. Les témoins préparés en parallèle ont présenté tous une croissance bactérienne ceci signifie que seul l'HE est responsable de l'inhibition des espèces bactériennes pathogènes.

Le (tableau V.11) illustre les seuils de concentrations minimales inhibitrices.

Chapitre V : Résultats et discussion

Tableau V.11 : Concentration minimale inhibitrice d'HE de persil.

Les souches pathogènes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Les dilutions des HE de persil					
	Témoin	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
klebsiella pneumoniae	+	-	+	+	+	+
Staphylococcus aureus	+	-	-	+	+	+

(+) : Croissance bactérienne

(-) : Absence de la croissance bactérienne

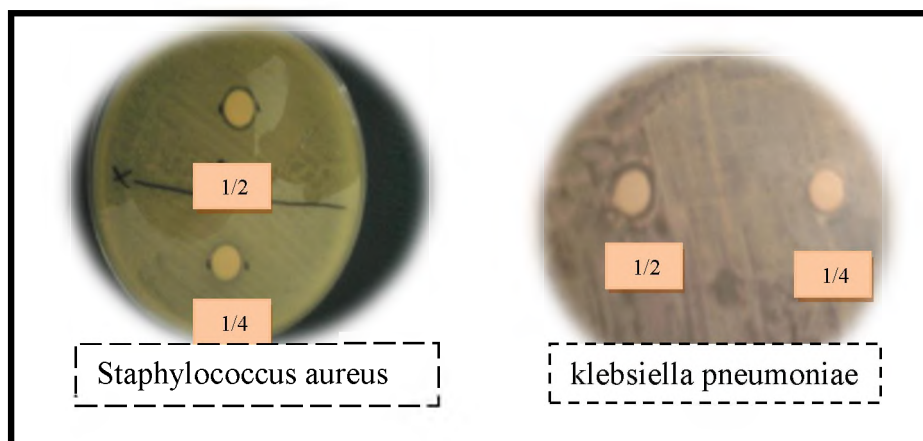


Fig V.6 : Des zones d'inhibitions des HEs des graines de persil vis-à-vis des bactéries pathogènes pour la CMI.

On note que la zone d'inhibition exprimée par son diamètre est matérialisée par une auréole claire autour du disque, alors que partout ailleurs, le développement des germes est visible

On remarque dans le (**tableau V.11**) que l'HE de persil présente une activité antibactérienne sur klebsella pneumoniae et staphylococcus aureus mais d'une manière différente d'un germe à un autre.

V.7. L'activité antioxydante

V.7.1. Test anti-radicalaire (Test DPPH)

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres, donc cette méthode est basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH en présence d'un antioxydant, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par les substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle (**fig V.7**), le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

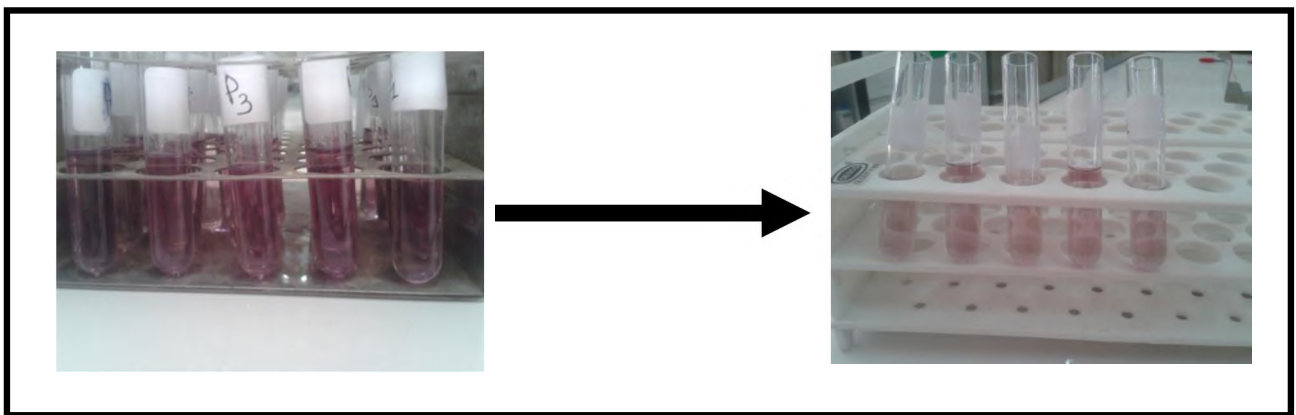


Fig V.7 : Le virage de couleur violet sombre vers le jaune pâle.

L'absorbance du DPPH mesuré à 517 nm montre une chute de cette dernière dans un intervalle très réduit de concentration. Ce qui est bien lisible dans la figure ci-dessous.

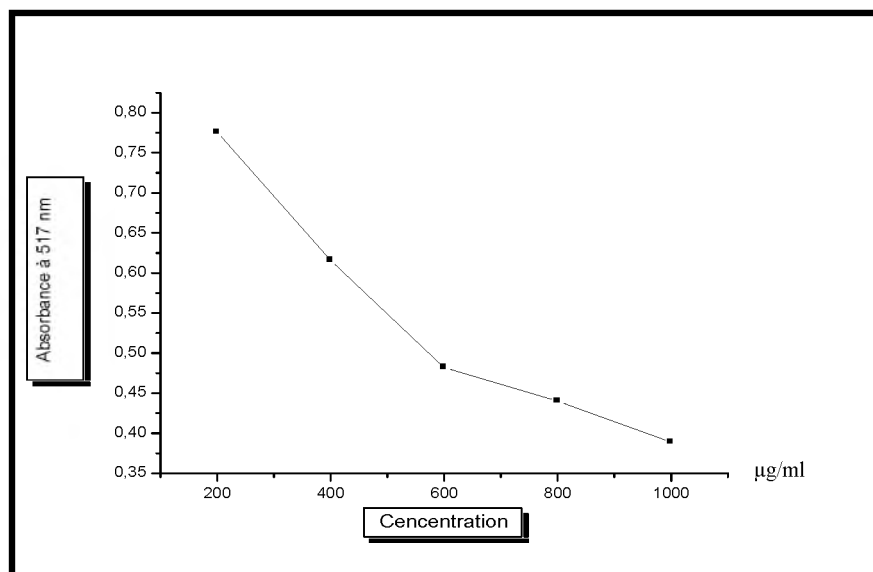


Fig V.8 : L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.

Chapitre V : Résultats et discussion

Les résultats obtenus lors du test de mesure le pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans le (tableau V.11) et la (figure V.9)

Tableau V.12 : Le pourcentage d'inhibition du DPPH.

Concentration $\mu\text{g/ml}$	200	400	600	800	1000
Abs	0,776	0,616	0,482	0,44	0,389
I %	39,46	51,95	62,4	65,67	69,65

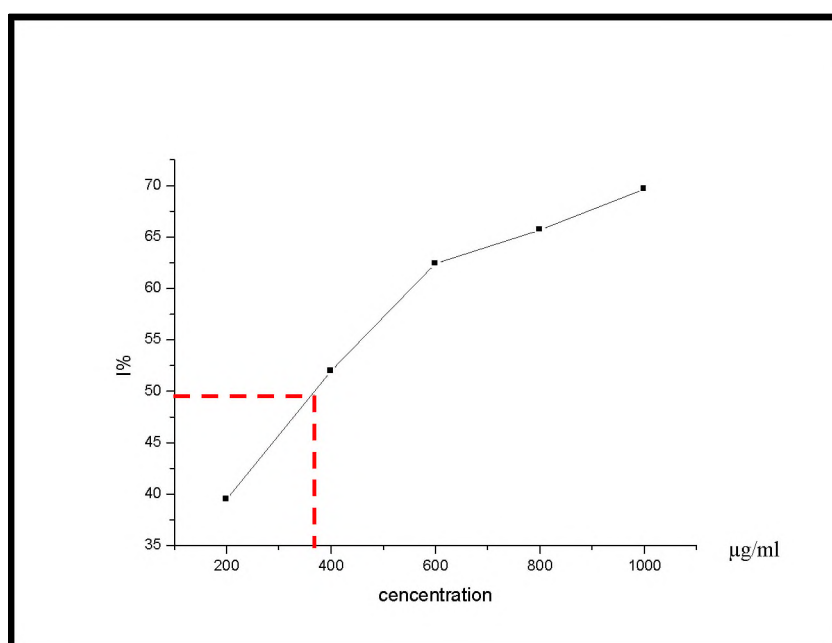


Fig V.9 : Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

La figure représente le pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction de concentration. Il montre que se dernier augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits de notre espèces.

- **Détermination d'IC₅₀**

IC₅₀ Est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la

Chapitre V : Résultats et discussion

valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande, un exemple de calcul est schématisé dans la (figure V.9).

L'huile essentielle du persil pouvait ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC₅₀ de 380 µg/ml. Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH, donc une bonne activité antioxydante.

V.7.2. Test de FRAP

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos composés est déterminée par la méthode de réduction de fer. Nous avons tracé la courbe qui représente la variation du pouvoir réducteur exprimé en absorbance en fonction de la concentration. On montre que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'augmentation de la concentration de notre échantillon.

Les résultats du test de réduction du fer (FRAP) de notre HE est présenté sur le tableau et la figure suivante :

Tableau V.13 : Les résultats de l'absorbance de différente concentration d'HE.

Concentration µg/ml	200	400	600	800	1000
Abs	0,393	0,431	0,543	0,639	0,657

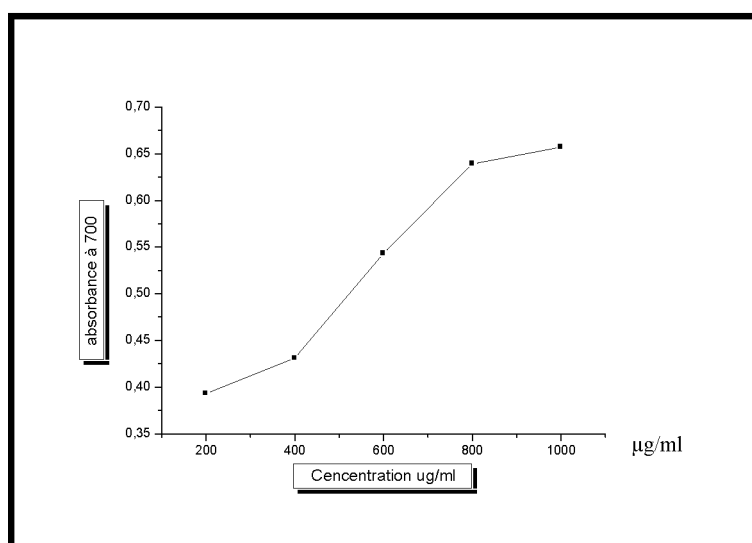


Fig V.10 : Absorbance en fonction de la concentration des huiles essentielles.

Chapitre V : Résultats et discussion

Nous avons remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne une solution de concentration, la solution change de couleur instantanément du jaune au vert (**fig V.11**). L'examen des résultats de ce test montre une fois encore que notre composé possède une forte activité antioxydante.

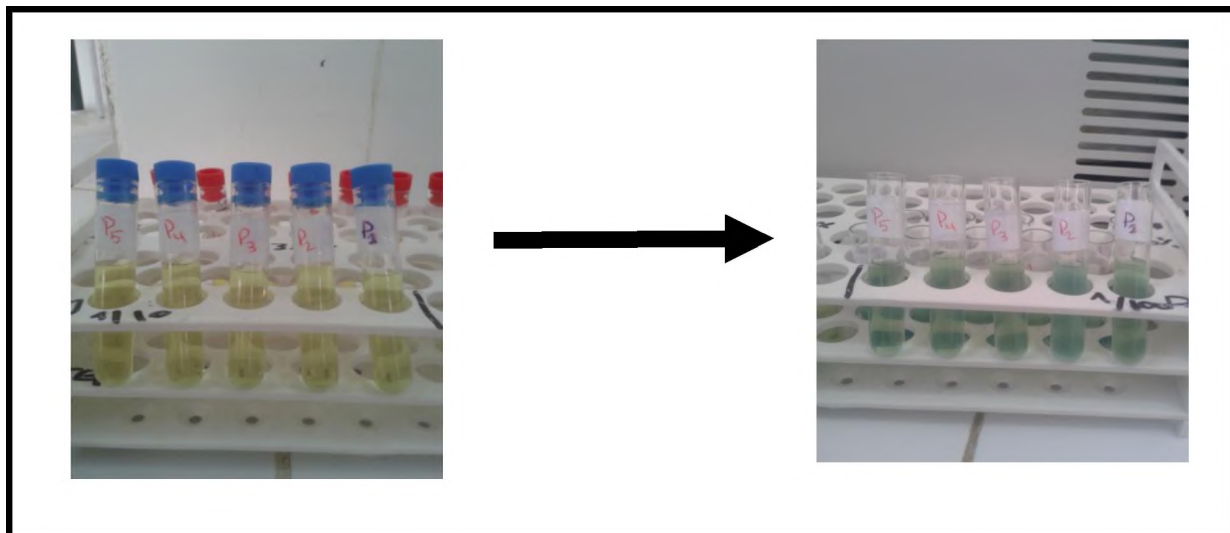


Fig V.11 : Virage de couleur de jaune au vert.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

D'après le travail effectué sur la plante médicinale, les graines de *Petroselinum Sativum* restent parmi les plus intéressantes.

L'idée directrice de notre étude consiste à extraire l'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum* provenant de la région d'Ain Defla, à déterminer ses propriétés physico-chimiques, à l'analyser par chromatographie et spectroscopie et à évaluer in vitro ses propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de différentes espèces bactériennes, ainsi que son activité anti-oxydante.

L'hydrodistillation, méthode de choix pour l'extraction des HEs dans des conditions de température de 100° C et de pression atmosphérique nous a permis de montrer que les graines de *Petroselinum Sativum* est riche en essence. Le rendement estimé varie de 1,8 à 2,1 %.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction,... indice d'acide, indice d'ester,...) de l'essence recueillie nous a conduits à des valeurs conformes aux normes.

Les résultats d'analyse chimique de la composition des HEs par chromatographie en phase gazeuse indiquent que l'HE des graines de *Petroselinum Sativum* est dominé par le Myristicine (23,71 %).

L'activité antibactérienne réalisés in vitro, ont permis d'évaluée l'action de l'huile de persil, sur 3 souches pathogènes et 3 autres probiotiques, d'une façon générale, notre extrait a une activité antibactérienne qui varie d'une souche à une autre, cette activité permet à notre huile d'être utilisé dans pas mal de domaine.

Les résultats de la CMI des HEs étant variables selon l'HE utilisée et la bactérie pathogènes testée.

Les résultats de l'évaluation de l'activité anti-oxydante de l'HE des graines de persil par la méthode de réduction de fer et celle du piégeage de radical libre DPPH montre que notre extrait possède un pouvoir antioxydant

Cette étude permet encore une fois la mise en valeur de l'exploitation des HEs dans les domaines, pharmaceutique et cosmétique. Par la même occasion, elle confirme leur utilisation comme conservateur dans le domaine de l'industrie agroalimentaire (augmenter la durée de conservation des aliments à la place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse).

Perspectives

Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies

- L'extraction des HEs à partir des autres parties de la plante,
- Effectuer des tests complémentaires sur d'autres bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Helicobacter pylori*,
- L'étude de leurs activités antifongiques, antivirales,...
- Extraire systématiquement l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel antibactérien. Puisque les hydrolats font l'objet de très peu d'études dans la littérature scientifique, ils constituent un créneau de recherche intéressant.

Le rendement en HE obtenue est très intéressant sur le plan économique pour d'éventuelle utilisation commerciale, cette opportunité ouvre la voie vers la mise en valeur de la plante et ces dérivés dans le développement économique durable et dans la création de la richesse renouvelable dans notre pays.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] : Chouitah O, "Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*", Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université d'Oran, 2011.

[2] : Madaoui Kh, Medjadji N, "Contribution à l'effet antioxydant de deux plantes médicinales locales", Thèse de master, Faculté des sciences, Université de Hassiba Ben Bouali-Chlef, 2014.

[3] : Noun A, " Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L.* de la région d'Ain Defla ", Thèse de master, Faculté des Sciences et de la technologie, Université de khemis miliana, 2014.

[4] : Paul I, Larousse "Encyclopédie des plantes médicinales", 2nd Edition, Paris, 2001.

[5] : Michel P, Caroline G, "Guide de poche de phytothérapie", Quotidien Malin éditions, Paris, 2013.

[6] : Daniel S et Max T, "Votre santé par les plantes", Alpen éditions, Paris, 2004.

[7] : Metchat S, "Etude des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles extraites à partir des graines de *Petroselinium sativum* et de *Apium graveleons*", Thèse de Master, Faculté des sciences, Université Hassiba Ben Bouali-CHlef, 2012.

[8] : Danièle F, Isabelle P, "Guide de poche d'aromathérapie", Editions Quotidien Malin, France, 2014.

[9] : Amelie M, "les plantes médicinales en Afrique et en Europe, Mémoire de fin d'étude", Edition diplom.de, Allemagne, 2003.

[10] : Abayomi S, "plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique", Edition Karthala (1^{er} édition), Ibadan, Nigeria, 2010.

[11] : Djabou N, " *Sambucus Nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine", Thèse de Magistère en chimie, Département de chimie, Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2006.

[12] : Hans W, "1000 plantes aromatiques et médicinales", Terres Editions, Paris, 2007.

[13] : Mekkiou R, "Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires d'espèces du genre *Genista* (Fabaceae) : *G. Sahare*, *G. Ferox*", Thèse de doctorat d'état, Département de chimie, Université de Mentouri- Constantine, 2005.

[14] : Odile C, Danielle R, "Botanique- Pharmacognosie- phytothérapie", 3^{ème} Edition, Paris, 2007.

[15] : Mazouz B, Hahdaoui A, "Caractérisation et l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum*", Thèse d'ingénieur d'état en biologie, Faculté des sciences agronomiques et des sciences biologiques, Université Hassiba Ben Bouali-chlef, 2010.

[16] : Base de données USDA national nutritif, pour la norme de référence de sorte 27.

[17] : Collectif, "Bien choisir ses plantes aromatiques", Editions Artémis, Paris, 2009.

[18] : Alix L-Delcourt, "Les herbes aromatiques c'est malin", Quotidien Malin Editions, Paris, 2013.

[19] : Pierre V, "Huiles essentielles, leur vertus bienfaisantes", Edition presses du châtelet, Paris, 2009.

[20] : Khenaka K, "Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin", Thèse de magister en microbiologie appliquée, Département de biochimie et de microbiologie appliquée, Université de Mentouri Constantine, 2011.

[21] : Abraham E, "Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué a l'*Hibiscus sabdariffa L.* et à l'*Artemisia annua*", Thèse de doctorat, Sciences des Agroressources, Ecole doctorale de science des procédés, 2006.

[22] : Besombes C, "Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : Applications généralisées", Thèse de doctorat, Génie des procédés industriels, Université de la rochelle (France), 2008.

[23] : Kesbi A, "Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*encalyptus globulus* dans la région de Ourgla", Thèse de Master, Faculté des Sciences et de la Technologie, Université de Kasdi Marbah Ourgla, 2011.

[24] : Makhloufi A, "Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis L*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru", Thèse de doctorat d'état en biologie, Faculté des sciences, Université de Aboubakr Belkaid, 2010.

[25] : Nait Achour Kh, "Etude de la composition chimique des essences de quatre especes d'eucalyptus poussant dans la région de Tizi Ouzou", Thèse de Magister, Faculté des Sciences, Université de Mouloud Mameri-Tizi Ouzou, 2012.

[26] : Ndéye Anta K, "Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales artisanales consommées au Sénégal", Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté de medecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, Université de Cheikh Anta Diop de Dakar, 2001.

[27] : Seddik M, "Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides Verticillata* de la région d'Adrar. Etude de son activité biologique et anti-oxydante", Thèse de magister, Faculté des sciences, Université d'Oran, 2010.

[28] : Nourachani I, "Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocarya crassifolia* (Lauraceae)", Mémoire d'études approfondies

(D.E.A), Département de biochimie fondamentale et appliquée, Université D'antananarivo, 2010.

[29] : Benzeggouta N, "Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments", Thèse de magister en pharmacochimie, Institut de chimie, Université Mentouri de Constantine, 2005.

[30] : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Mai 2008.

[31] : Benayad N, "Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées", Projet de recherche, Faculté des sciences de rabat, Université Mohammed V-Agdar, 2008.

[32] : Hellah Z, "Contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur sardine (*Sardina pilchardus*)", Thèse de magister, Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ourou, 2011.

[33] : Lahrech Kh, "Extraction et analyse des huiles essentielles de *Mentha pulegium L.* et de *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques", Thèse de Magister, Département de chimie, Université d'Oran Es-Sénia, 2010.

[34] : Elisabeth Lucchesi M, "Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles", Thèse de doctorat, Faculté des sciences et technologies, Université de la Réunion, 2005.

[35] : Lamamra M, "Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula (L.) Parl.* et de *Filipendula hexapetala Gibb.*", Thèse de magister, Faculté des Sciences, Université de Ferhat Abbas-Setif, 2008.

[36] : Benbouali M, "Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : « Mentha rotundifolia et Thymus vulgaris »", Thèse de magister, Faculté des sciences et science de l'ingénieur, Université de Hassiba Ben Bouali-Chlef, 2006.

[37] : Mohammedi Z, "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen", Thèse de magistère, Faculté des sciences, Université de Abou Bakr Beikaid Tlemcen, 2006.

[38] : AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2).

[39] AFNOR, "Les huiles essentielles", 3^{ème} Edition, Recueil des normes françaises, Paris, 1989.

[40] : Zinet H, Mehlabi M, "Composition chimique, Activité Antibactérienne et Activité Larvicide des huiles essentielles de l'Ocimum basilicum", Thèse de master, Faculté de science et technologie, Université de Khemis Miliana, 2013.

[41] : Goumni Z, Salhi A, "Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extrait de la plante Laurus Nobilis L", Thèse de Master, Faculté de Science de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Kasdi Merbah – Ouargla, 2013.

[42] : Document édité avec la collaboration de l'OMS, "Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale", 6^{ème} Edition, Algérie, 2011.

[43] : Chikhi I, " Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie", Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2014.

[44] : Fekih N, "Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genres PINUS poussant en Algerie", Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2014.

[45] : Benhammou N, " Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien ", Thèse de doctorat, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Des sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2012.

Annexe

Annexe 1

Détermination de la densité relative

Réactifs :

- Ethanol pour le nettoyage
- Eau distillée

Appareillage :

- Verre de montre
- Balance analytique

Annexe 2

Détermination de l'indice de réfraction

Réactifs :

- Ethanol
- Eau distillée

Appareillage :

- Réfractomètre muni d'un thermomètre

Annexe 3

Détermination de l'indice d'acide

Réactifs :

- Ethanol à 95%, récemment neutralisé par la solution d'hydroxyde de potassium, en présence de phénolphtaléine
- Hydroxyde de potassium à 0,1 N
- Phénolphtaléine à 1%

Appareillage :

- Fiole conique, de 250 ml ou ballon à large col, de 100 ml de capacité
- Burette
- Pipette
- Balance analytique, précise à 0,001 g près
- Eprouvette, de 5 ml de capacité

Annexe 4

Détermination de l'indice d'ester

Réactifs :

- Hydroxyde de potassium éthanolique à 0,5 N
- Acide chlorhydrique à 0,5 N
- Phénolphtaléine à 2%

Appareillage :

- Ballon (250 ml)
- Réfrigérant à reflux
- Eprouvette
- Burette de 25 ml
- Balance analytique

Annexe 5

Détermination de pH

Réactifs :

- Solution tampon (pH 4, 7, 10)
- L'huile essentielle
- Eau distillée

Appareillage :

- Becher
- pH mètre

Annexe 6

Composition de milieu de culture CHROMagar

Formule par litre d'eau purifiée

- Chromopeptone 16,1 g
- Mélange chromogène 1,3
- Gélose 15,0

pH 6,9 ± 0,2

Annexe 7

Composition de milieu de culture M17

La formule de ce milieu (en grammes par litre d'eau distillée) est la suivante :

- Tryptone 5,0
- Peptone de soja 5,0
- Infusion de viande 5,0
- Extrait de levure 2,5
- Glycérohydrogénophosphate de sodium 19,0
- Lactose 0,5
- Acide ascorbique 0,5
- Sulfate de magnésium 0,25
- Agar 11,0

pH = 6,9

Annexe 8

Composition de milieu de culture MRS en g (Gélose de man, Rogosa, Sharpe)

- Peptone 10, 0
- Extrait de viande 8,0
- Extrait de levure 4,0
- Glucose 20,0
- Acétate de sodium trihydraté 5, 0
- Citrate d'ammonium 2, 0
- Hydrogénophosphate de potassium 2,0
- Sulfate de magnésium heptahydraté 0, 2
- Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05
- Agar 10,0
- Tween 80 1,0 ml

pH = 6,2

Annexe 9

Composition de milieu de culture Mueller-Hinton

- Extrait de viande de boeuf : 2.0g.
- Peptone de caséine : 17.5g.
- Amidon de maïs : 1.5g.
- Agar : 17.0g.

pH : 4,7

Annexe 10



Etuve



Des boîtes pétries incubées dans l'étuve



Autoclavage des milieux de culture



Balance analytique



Chauffage a reflux



Plaque chauffante



Vortex