

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETAL

II.1.1 Origine géographique et période de récolte

La *Rétama sphaerocarpa* est un arbrisseau de 1 à 2 m à rameaux pubescents plus ou moins dressés, caractérisés par de petites fleurs jaunes (5-6 mm), situées en grappes latérales sur les rameaux âgés, feuilles très petites, gousses globuleuses, jaune brun (**Figure I.1**) [1].

Rétama sphaerocarpa a été récoltée de la région de Maadid, à 20 Km de la wilaya de M'sila durant le mois de mars 2019.



Figure I.1 : Plante de *Retama sphaerocarpa*



Figure II.1 : google map au niveau de la région de la wilaya de M'sila (Maadid).

II.1.2 Préparation du Matériel végétal

Nous avons utilisé les parties aériennes de *Paronychia Argentea*, qui sont séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant plusieurs jours. Après séchage, ils ont été sélectionnés et conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité en vue de son utilisation pour la préparation des huiles essentielles.

II.2 EXTRACTION

II.2.1 Techniques d'extraction des huiles essentielles

L'obtention des huiles essentielles fait appel à diverses techniques d'extraction. Certaines sont plus anciennes et simples d'opération et d'autres plus récentes et performantes mais plus complexes. Ces dernières visent à optimiser la qualité de l'huile, tout en maintenant un rendement intéressant. Les techniques d'extraction les plus employées sont : la distillation et l'extraction par les solvants organiques :

II.2.1.1 Distillation

Le principe de la distillation se base sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation [19].

Il existe deux principaux modes de distillation : L'hydrodistillation et la distillation à la vapeur d'eau qui est décrites brièvement ci-dessous.

- Par hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un alambic rempli d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [19]. L'inconvénient de cette méthode est que la matière végétale risque facilement de se calciner, ce qui entraîne une modification de la composition chimique et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle [22].

- Distillation à la vapeur d'eau

C'est le procédé qui est le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des usages thérapeutiques[38]. Dans ce cas, la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau, mais il est traversé par un courant de vapeur d'eau[37]. La distillation à la vapeur s'effectue en plaçant les plantes aromatiques sur une grille perforée en dessus de la base de l'alambic. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes ; l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat[20].

Il existe une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau qui est l'hydro diffusion. Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar). À travers la masse végétale du

haut vers le bas. La composition des produits obtenu est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classique le procédé permet un gain de temps et d'énergie [19].

II.2.1.2 Par solvant organique

Certaines huiles essentielles ont une densité proche à celle de l'eau et le procédé de distillation ne peut être utilisé d'où la nécessité de recourir à une extraction par solvants organiques, malgré leur faible pourcentage d'utilisation 3%.

Il existe deux principaux modes : par solvant volatil et par solvant fixe.

- *Par solvant volatil*

L'extraction par solvant volatil consiste la mise en contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants soluble contenus dans la plante dans le solvant évacué, l'opération peut être renouvelée plusieurs fois sur la même charge de matière végétal.

Actuellement les solvants les plus utilisés dans l'industrie sont : l'hexane, l'alcool éthylique et l'eau [47].

- *Par solvant fixe*

Cette méthode est appelée aussi extraction par épuisement au moyen du corps gras, la solubilité des essences végétales dans les corps gras est un phénomène observé depuis longtemps et dans l'antiquité, on connaissait des huiles parfumées par infusion des fleurs notamment des roses dans une huile végétal [47].

Cette opération faite à froid porte le nom d'enfleurage et faite à chaud dans la graisse fondue celui de macération.

II.2.1.3 Enfleurage

L'enfleurage est un procédé d'extraction très ancien, utilisé surtout pour des fleurs délicates comme les roses et le jasmin, l'artisan dépose les pétales de la fleur sur un corps gras purifié qui s'imbibe peu à peu des parfums, lorsque le corps gras atteint son poids de saturation et qu'il ne peut absorber davantage de parfum, l'artisan nettoie la pommade obtenue.

Puis, il ajoute de l'alcool, il laissera en suite le tout se mélanger pendant environ 24 heures, cette étape sert à séparer le corps gras et les huiles essentielles. En dépit de grande qualité des huiles essentielles obtenues par enfleurage. Cette méthode n'est plus très courante, l'enfleurage est en

effet un procédé très laborieux et il nécessite beaucoup de temps. Cependant les huiles essentielles ainsi obtenues coûtent donc très chères[48].

II.2.1.4 Macération

Dans cette méthode, les fleurs sont immergées dans des graisses fluides de nature animale ou végétale. Cette immersion est réalisée dans des fioles en cuivre tapissées à l'intérieur d'une couche de Zinc.

Ces fioles sont mises sur un bain marie à une température d'ébullition pour l'obtention d'un mélange lipidique, ce mélange est ensuite centrifugé pour récupérer l'huile essentielle, alors que la couche restante est traitée par l'alcool 90%.

Après le refroidissement, le mélange est agité jusqu'à ce que l'alcool se sature d'huile essentielle, Ainsi que la phase alcoolique est alors récupérée puis épuisée à une température de 30°C, et le résidu obtenu est appelé l'huile absolue [48].

II.2.2Extraction des huiles essentielles de l'espèce *Rétama sphaerocarpa*

L'extraction d'huile essentielle a été réalisée au niveau de laboratoire de biologie à l'université M'sila,Parl'appareil d'extraction des H.E Clevenger (**Figure II.2**).



Figure II.2 : l'extraction des huiles essentielles par Clevenger.

- Mode opératoire

Une masse de (58,62 g) de notre plante *Rétama sphaerocarpa* est introduite dans un ballon en verre (2) de 2000 ml contenant une quantité suffisante d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon (1), les vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical (3) puis dans le réfrigérant (4), où on aura lieu la condensation. Les

gouttelettes ainsi produites s'accablent dans le tube (5) rempli au préalable d'eau distillée (Figure II.3).

En raison de la différence de densité, l'huile essentielle surnage à la surface de l'eau. L'hydrodistillation dure 4 heures. Les huiles essentielles obtenues sont recueillies dans un flacon à l'abri de la lumière et stockée à (4-6°C) jusqu'aux tests antioxydantes et tests antimicrobiens.

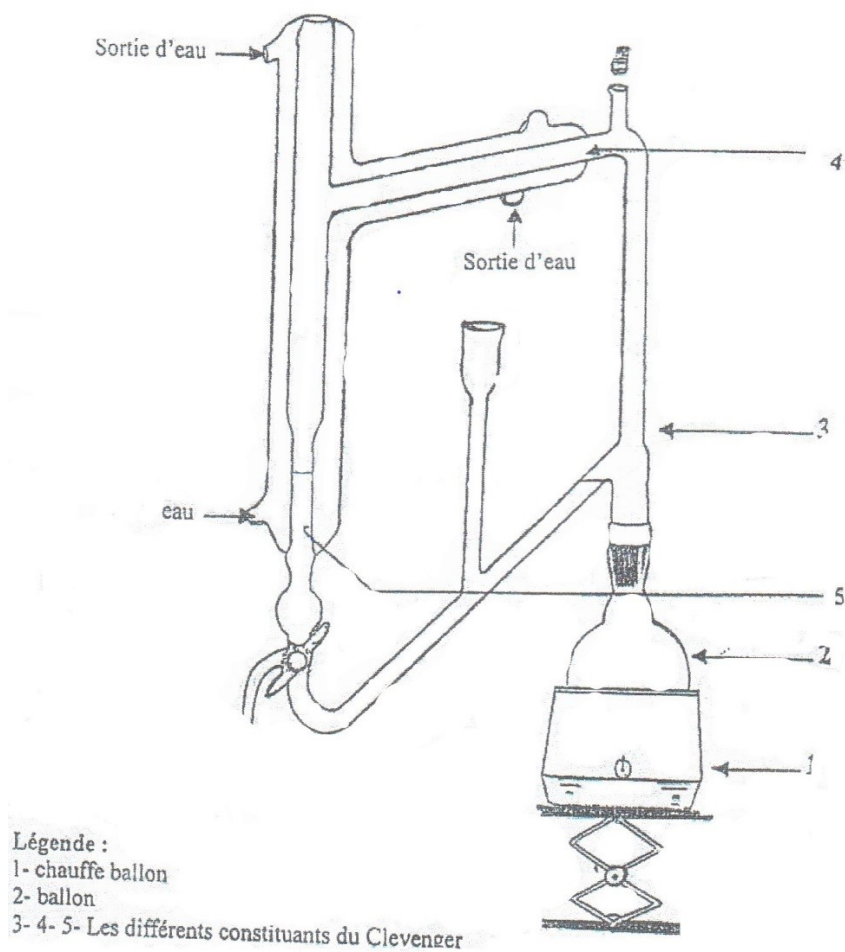


Figure II.3 : Appareil de Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles.

- Caractères organoleptiques des huiles essentielles

- Aspect : liquide
- Couleur : jaune clair
- Odeur : Aromatique

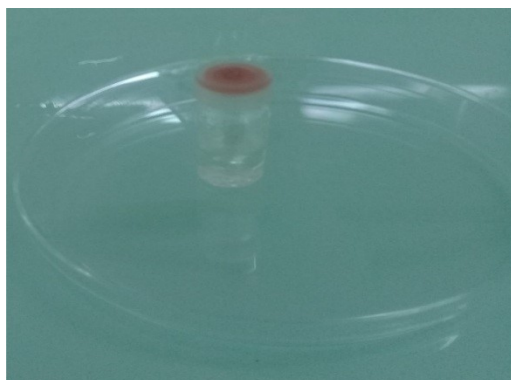


Figure II.4 : Huile essentielle de *rérama sphaerocarpa*.

- Calcul du rendement

$$R\% = \mathbf{M/M_0} \times \mathbf{100}$$

- R (%) : Rendement exprimé en %.
- M : Masse d'huiles essentielles récupérées.
- M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

II.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Dans notre travail, nous avons choisi la méthode de piégeage du radical DPPH pour valoriser le pouvoir antioxydant. Ce radical de couleur violacée, absorbe entre 515 et 520 nm. En présence d'antioxydant, il est réduit en changeant sa couleur au jaune [52].

- Matériel et produits utilisés

- Eau distille.
- Méthanol 96%.
- BHT (Hydroxytoluène butylé)
- DDPPH (2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)
- Micropipette, portoire et tubes à essai

- Mode opératoire

La capacité des extraits de la plante à piéger le radical libre DPPH est évalué en utilisant la méthode décrite par [53] : A 0,5 ml d'une solution méthanoïque de DPPH à 0,1mM, est ajouté 1,5 ml d'extrait à différentes concentrations. Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en

mélangeant 1,5 ml de méthanol avec 0,5 ml de la solution méthanoïque de DPPH. Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'expérience est réalisée en triplicata.

Une expérience de contrôle positif a été effectuée en utilisant le BHT dont les concentrations varient entre 1 et 100 µg/ml.

- Calcul de pourcentage d'inhibition

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre DPPH est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH selon l'équation suivante.

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs1 - Abs2) / Abs1] \times 100$$

Où : Abs 1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

Abs 2 : absorbance en présence d'extrait ou du standard (BHT).

- Calcul de concentration inhibitrice IC₅₀

La concentration inhibitrice (IC₅₀) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire et neutraliser 50% du radical DPPH.

Les IC₅₀ sont déduits graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

II.4 POUVOIR ANTIBACTERIENNE

- Matériel et produits utilisés

- Pipette pasteur ou micropipette.
- Disque stérile de papier Wattman.
- Souches bactérienne.
- Boite de pétri.
- Les anti-bioéthique
- Ecouvillons stérile.
- Milieu culture de MULLER-HINTON.
- Diméthylsulfoxyde (DMSO).

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rétama sphaerocarpa*, nous avons utilisé :

II.4.1 Méthode de diffusion du disque l'aromagramme

C'est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles sur la croissance des germes par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huiles essentielles ou de produit à base d'huiles essentielles.

On utilise des disques stériles de diamètre de 6mm imprégnés des différentes concentrations d'huiles essentielles et dépose à la surface d'un milieu gélose en boîte pétrie préalablementensemencé en surface à l'aide d'une suspension standardisée.

Le milieu de culture Muller-Hinton *Mutriet* a été coulé dans des boîtes de pétri stériles. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'un écouvillon, on étale la bactérie sur la surface du milieu de culture de façon à avoir une dispersion homogène de la bactérie sur toute la surface du milieu.

Après une incubation aérobie pendant 24 heures à 37°C, l'activité antibactérienne a été estimée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en mm qui correspond à la distance autour des disques où nous constatons une absence totale de culture bactérienne. En parallèle nous avons utilisé des témoins pour vérifier leur croissance après incubation [53].

Si les diamètres des zones d'inhibition sont :

$\emptyset < 8$: La bactérie résistante.

$8 < \emptyset < 14$: La sensibilité est limite.

$14 < \emptyset < 20$: Un peu sensible.

$\emptyset > 20$: La bactérie est très sensible.

II.4.2 Méthode de dilution

Cette méthode est basée sur diminution de la concentration d'huile essentielle de *ré tama sphaerocarpa* testé par DMSO. La méthode est résumée par l'organigramme de la **figure II.5**.

II.4.3 Les souches testées

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

- *Escherichia coli* (*I*) (*Gram -*) : Est un bacille à gram négatif, mobile et aérobie [55], elle est découverte par Escherichia en 1885 [56].

- *Staphylococcus aureus* (Gram +) : Elle a été identifiée de l'aube de l'être pasteurienne par pasteur en 1820 [57,58]. Elle est responsable d'un très grand nombre d'infection chez l'homme et animale.

- *Bacillus sp* (Gram +) : Est une bactérie à Gram positif vivant dans le sol, elle produit des enzymes intéressantes pour l'industrie. Inoffensive pour l'homme [57].

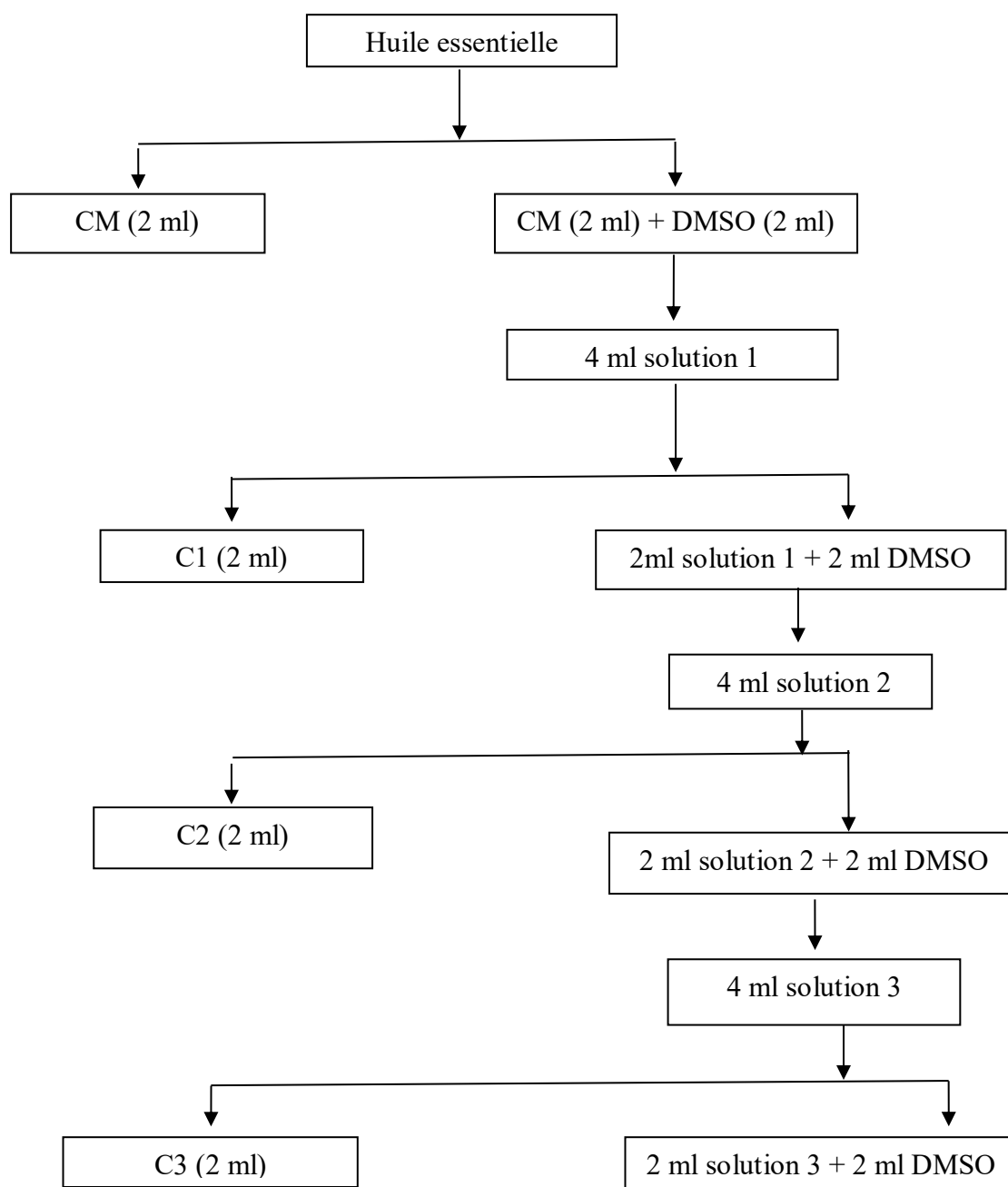


Figure II.5: Organigramme de la méthode de dilution.

Tableau II.1 : liste des souches microbiennes testées.

Souche testée	N°ATCC
Escherichia coli (I)	ATCC 8739
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Bacillus subtilis subsp	ATCC 6633

II.4.4 Les Antibiotiques

- Définition

Les Antibiotiques (mot grec anti : contre et bio : la vie) sont des substances chimiques qui ont une action spécifique avec un pouvoir destructeur sur les microorganismes. Elles sont dépourvues de toxicité pour les autres cellules. Ces molécules peuvent avoir une action drastique, c'est-à-dire bactéricide ou fongicide, leur efficacité peut être limitée à empêcher le développement des micro-organismes (action bactériostatique ou fongistatique) [59].

- Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

L'action des antibiotiques sur une bactérie s'exerce sous certains qui déterminent largement leur action bactériostatique ou bactéricide [56]. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est variable, les bactéries à gram + étant généralement plus sensibles que ceux à gram-.

Le Tableau N°2 représente la sensibilité des certaines souches bactériennes aux antibiotiques néanmoins il faut que cette sensibilité doive toujours être vérifiée par un Antibiotique [59,60].

Tableau II.2 : Sensibilité des souches aux antibiotiques.

Souches bactériennes	Sensibilité aux Antibiotiques
Escherichia coli	Aminopénicillines, Céphalosporines, Quinolones, Aminosides, Triméthoprime, Gentamicine.
Staphylococcus aureus	Aminosides (Gentamicine et tobramycine), Macrolides (Erythromycine et la Spiromycine), Ticarciline, Amoxicilline

Bacillus sp	Ticarciline, Amoxicilline, Gentamicine
-------------	--

II.5 METHODES D'IDENTIFICATION STRUCTURELLE

II.5.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-Visible)

Ces mesures spectrales sont importantes dans l'identification de plusieurs constituants de l'huile. Dans cette technique on utilise des solutions de la plantes très diluées contre un blanc qui est le solvant, le solvant le plus utilisé en ultraviolet, est l'éthanol à 15% dont la plus part des composés sont très solubles, les composés incolores absorbent dans une région de spectre variant entre 200 et 400 nm, alors que ceux colorés présentent une région d'absorption comprise entre 200 et 700 nm.

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

- *Application de l'UV-Visible*

- Détermination de concentrations inconnues.
- Détermination de la masse moléculaire.
- Recherche de la structure.
- Identification d'un chromophore à l'aide de spectre de comparaison [49].

II.5.2 Spectrométrie infrarouge (IR)

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

Le spectre IR est largement utilisé dans l'identification des constituants des huiles essentielles et surtout, après leur séparation par la technique de CPG [50].

- *Application de l'infrarouge*

Les spectroscopies IR permettent d'effectuer les déterminations suivantes :

- Identification des groupements fonctionnels.

- Teste d'identité.
- Contrôle de réaction de synthèse et détermination de la structure [51].

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETAL

II.1.1 Origine géographique et période de récolte

II.1.2 Préparation du Matériel végétal

II.2 EXTRACTION

II.2.1 Techniques d'extraction des huiles essentielles

II.2.1.1 Distillation

- Par hydrodistillation

- Distillation à la vapeur d'eau

II.2.1.2 Par solvant organique

- Par solvant volatil

- Par solvant fixe

II.2.1.3 Enfleurage

II.2.1.4 Macération

II.2.2 Extraction des huiles essentielles de l'espèce *Rétama sphaerocarpa*

- Mode opératoire

- Caractères organoleptiques des huiles essentielles

- Calcul du rendement

II.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE

- Matériel et produits utilisés

- Mode opératoire

- Calcul de pourcentage d'inhibition

- Calcul de concentration inhibitrice IC₅₀

II.4 POUVOIR ANTIBACTERIENNE

- Matériel et produits utilisés

II.4.1 Méthode de diffusion du disque l'aromagramme

II.4.2 Méthode de dilution

II.4.3 Les souches testées

II.4.4 Les Antibiotiques

- Définition

- Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

II.5 METHODES D'IDENTIFICATION STRUCTURELLE

II.5.1 Spectrométrie ultraviolet (UV-Visible)

- Application de l'UV-Visible

II.5.2 Spectrométrie infrarouge (IR)

- Application de l'infrarouge