

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 01

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Populations et des Organismes



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : **Phytothérapie et santé**

Thème

**Évaluation de quelques activités biologiques de l'huile essentielle de
Gingembre *Zingiber officinale* L.**

Présenté par :

Soutenu le : 20 /09/2016.

Boumalha Manel

Rebahi Nesrine

Devant le jury :

M ^{me} AMARA N.	MAA	Université Blida 1	Présidente
M ^{me} AMEDJKOUH H.	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
M ^{me} FAIDI H.	MAB	Université Blida 1	Promotrice
M ^{me} HALLI L.	Doctorante	CRD- SAIDAL	Co-promotrice

Promotion : 2015/2016

Sommaire**INTRODUCTION**.....**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE****I. LES HUILES ESSENTIELLES**

- I.1. Généralités.....
- I.2. Répartition et localisation
- I.3. Composition chimiques.....
 - I.3.1. Les terpènes
 - I.3.2. Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane.....
 - I.3.3. Les composés d'origines diverses
- I.4. Propriétés
- I.4.1. Physico-chimiques
- I.4.2. Biologiques.....
- I.5. Conservation.....
- I.6. Notion de chémotype.....
- I.7. Méthodes d'extraction
- I.7.1. Hydro-distillation
- I.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau
- I.7.3. Hydrodiffusion.....
- I.7.4. Enfleurage
- I.7.5. Extraction par solvants organiques
- I.7.6. Extraction par CO₂ supercritique
- I.7.8. Extraction assistée par micro-ondes
- I.7.9. Expression à froid
- I.8. Toxicité.....

II. LE GINGEMBRE (*Zingiber officinale* L.)

- II.1. La famille des Zingibéracées
 - II.2. Dénomination internationale.....
 - II.3. Historique
 - II.4. Classification botanique.....
 - II.5. Description botanique
 - II.6. Composition chimique
 - II.7. Écologie
 - II.8. Propriétés pharmacologiques
 - II.9. Usages traditionnels
-

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL

- I.1. Matériel végétal
- I.2. Matériel animal
- I.3. Souches microbiennes

II METHODES

- II.1. Extraction des huiles essentielles.....
- II.2. Calcul du rendement en huile essentielle.....
- II.3. Détermination de la teneur en eau des rhizomes.....
- II.4. Détermination des Caractéristiques physico-chimiques de l'HE.....
- II.5. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....

III Evaluation des activités biologiques

- III.1. Activité antimicrobienne.....
 - III.1.1. Aromatogramme
 - III.1.2. Microatmosphère
 - III.1.3. Lecture des résultats.....
- III.2. Activité anti-inflammatoire
- III.3. Activité Antioxydante.....
 - III.3.1. Expression des résultats.....

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- I. Rendement en huile essentielle
- II. Teneur en eau
- III. Caractérisation de l'HE.....
 - III.1. Caractéristiques physico-chimiques.....
 - III.2. Composition chimique (CPG)
- VI. Evaluation des activités biologiques.....
 - VI.1. Activité antimicrobienne
 - IV.1.1. Aromatogramme.....
 - IV.1.2. Micro atmosphère.....
 - VI.2. Activité anti-inflammatoire.....
 - VI.3. Activité antioxydante.....

CONCLUSION.....

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES.

Notre étude a porté sur l'évaluation de quelques activités biologiques de l'huile essentielle (HE) de gingembre (*Zingiber officinale* L.).

L'hydrodistillation des rhizomes frais a donné un rendement en HE de 1,42% avec un indice de réfraction de 1.49, un indice d'acide de 0159, un indice de saponification de 178.125, un indice d'ester de 177.966, une densité relative de 0,864 et un pH de 5,5.

La technique de la chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier dix principaux composants chimiques de l'huile essentielle extraite. Le composant majoritaire est le zingébérène (17,75%) suivi par e-citral (11,12%), z-citral (8,11%), sesquiphellandrène (7.92%), ar-Curcumène (7.14%), Camphène (5.31%), Ocimène (5.22%), β -bisabolène (4.34%) et Farnesol (3.66%),

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme a montré que l'HE de gingembre ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* par contre elle inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* (ZI= 34mm), *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* (ZI= 14mm) et *Esherichia coli* (ZI= 11.5).

La méthode de la microatmosphère a révélé que la fraction volatile de l'HE présente aussi une activité antimicrobienne très marquée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (ZI= 55mm) de *Staphylococcus aureus* (ZI= 33mm), *Candida albicans* (ZI= 19mm) et *Sacharomyces cerevisiae* (ZI= 15mm) et reste sans effet sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus niger*.

L'HE et hydrolat de gingembre réduisent l'œdème de 22,04% et 14,55% respectivement ce qui traduit une faible activité anti-inflammatoire comparée au médicament de référence Dichlofénac (54,16%).

L'estimation du pouvoir antiradicalaire évalué par la méthode du DPPH (2,2-Diphenyle-1-picrylhydrazyl) a révélé que l'HE du gingembre présente une forte activité antioxydante (IC_{50} = 0,7%) comparable à celle donnée par l'acide ascorbique (IC_{50} = 0,6%).

Mot clés : Huile essentielle, *Zingiber officinale*, Antioxydant, Antimicrobien, Anti-inflammatoire, CPG.

تهدف هذه الدراسة الى تقييم بعض الخصائص البيولوجية للزيوت الاساسية الموجودة في الزنجبيل (*Zingiber officinale* L.).

الهيدروستيلاسيا للجذور الطازجة اعطى نسبة من للزيوت الاساسية تقدر ب 1.42% حيث يقدر كل من :مؤشر الانكسار ب 1.49, مؤشر الحموضة ب 0,0159, مؤشرة لتصبين ب 178.125, مؤشر الاستر ب 177.966, الكثافة النسبية ب 0.864 و pH ب 5.5.

سمحت تقنية الكروماتوغرافيا الغاز بتحديد عشرة مواد كيميائية في الزيت الاساسي المستخلص.المكون الاساسي هو (17,75%) zingébérène, ثم (11,12%) e-citral, (8,11%) z-citral, (7.92%) sesquiphellandrène, (7.14%), β -bisabolène (4.34%), Ocimène (5.22%), Camphène (5.31%), ar-Curcumène و Farnesol (3.66%).

اظهر تقييم النشاط الميكروبي بطريقة الاروماتوغرام للزيت الاساسي للزنجبيل ان ليس له أي تأثير كايح على نمو *Pseudomonas aeruginosa*, و العكس بالنسبة لـ *Bacillus subtilis* حيث له تأثير على نمو (ZI= 34mm), *Esherichia coli* (ZI= 11.5), *Aspergillus niger* (ZI= 14mm) *Staphylococcus aureus* كشفت طريقة الميكرواوموسفير ان الجزء الطيار في الزيت الاساسي له خصائص مضادة للنشاط الميكروبي بصفة ملحوظة, حيث ان *Bacillus subtilis* (ZI= 55mm), *Staphylococcus aureus* (ZI= 33mm), *Candida albicans* (ZI= 19mm) و *Sacharomyces cerevisiae* (ZI= 15mm) و ليس له تأثير على *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, و *Aspergillus niger*.

الزيت الاساسي و hydrolat الزنجبيل خفض نسبة الو ذمة ب 22.04% و 14.55% على التوالي و هذا مايعكس ان له خصائص مضادة للالتهاب ضعيفة و هذا بالمقارنة بالدواء المرجعي (Dichlofénac (54,16%).

اظهرت نتائج تقييم الخصائص المضادة للاكسدة بطريقة DPPH (2, 2-Diphenyle-1-picrylhydrazyl) ان الزيت الاساسي للزنجبيل له نشاط مضاد للاكسدة بنسبة عالية (IC₅₀= 0,7%), وهذا بالمقارنة مع l'acide ascorbique (IC₅₀= 0,6%).

المفردات الجوهرية: الزيت الاساسي, *Zingiber officinale*, مضاد للاكسدة مضاد للمكروبات و الالتهاب,

The study focused on the evaluation of some biological activities of essential oil (HE) of ginger (*Zingiber officinale* L.).

The steam distillation of fresh rhizomes in a yield of 1.42% ET with a refractive index of 1.49, an acid value of 0159, a saponification value of 178 125, an ester of 177,966, a density relative 0.864 and a pH of 5.5.

The technique of gas chromatography has identified ten key chemicals in the extracted essential oil. The major component is the zingéberène (17.75%) followed by e-citral (11.12%), z-citral (8.11%), sesquiphellandrene (7.92%), ar-curcumene (7.14%), Camphene (5.31%), ocimene (5.22%), β -bisabolene (4.34%) and Farnesol (3.66%),

The evaluation of the antimicrobial activity by the method of aromatogramme showed that ginger HE shows no inhibitory effect on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* against it inhibits the growth of *Bacillus subtilis* (ZI = 34mm), *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* (ZI = 14mm) and *Escherichia coli* (ZI = 11.5).

The method of microatmosphere revealed that the volatile fraction of the ET also exhibits antimicrobial activity very marked vis-a-vis *Bacillus subtilis* (ZI = 55mm) *Staphylococcus aureus* (ZI = 33mm), *Candida albicans* (ZI = 19mm) and *Saccharomyces cerevisiae* (ZI = 15mm) and has no effect on *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus niger*.

The HE and ginger hydrolat reduce edema of 22.04% and 14.55%, respectively, reflecting a weak anti-inflammatory activity compared to the reference product Diclofenac (54.16%).

The estimate of the radical scavenger power evaluated by the method of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) revealed that HE ginger exhibits strong antioxidant activity ($IC_{50} = 0.7\%$) similar to that given by ascorbic acid ($IC_{50} = 0.6\%$).

Key words: essential oil, *Zingiber officinale*, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, CPG.

L'utilisation des plantes en tant que remèdes, que se soit sur le plan physique ou des plans plus subtils, est commune à toutes les cultures (**MCLNTYRE, 2011**). Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**SCHAUENBERG et FERDINAND, 2006**).

De nos jours, les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**HANS, 2007**) et dans le monde entier, des plantes susceptibles d'être utilisées comme base de nouveaux traitements sont recherchées dans la nature. Cette dernière constitue un immense gisement de molécules actives d'origine végétales, et les ressources de la flore sont loin d'être totalement inventoriées (**LEROUX, 2007**).

La plupart des propriétés des plantes sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (**RASHID et al., 2010**), qui prennent une place de plus en plus importante dans notre quotidien. On s'en sert tout à la fois pour éloigner le mauvais sort, se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture, conserver les aliments voire les morts (**TERNYNCK et MARSEILLE, 2012**). Ces huiles présentent des activités biologiques et thérapeutiques variées (antivirales, anti-inflammatoires, antioxydantes, anticancéreuses) (**SVOBODA et HAMPSON, 1999**) qui sont dus aux centaines de molécules chimiques qui les constituent comme les terpénoïdes (**COWAN, 1999**).

Le gingembre (*Zingiber officinale* L.) est l'une des plantes médicinales productrices d'huiles essentielles, elle a fait l'objet de notre étude. C'est une plante dotée de vertus aux pouvoirs curatifs non encore mises à jour, elle a même été citée dans le saint Coran. Les rhizomes sont utilisés en médecine traditionnelle en Asie et leurs huiles essentielles est indiquée pour de nombreux problèmes de santé (**FOLLIARD, 2014**). En effet, plusieurs travaux ont montré le pouvoir anti-inflammatoire (**RAJI et al., 2002 ; BADRELDINE et al., 2007 ; LANTZ et al., 2007**), antimicrobien (**SASIDHARAN et MENON, 2010 ; ALI HASAN et al., 2012 ; GOETZ et GHEDIRA 2012**) et antioxydant de la plante (**GOVINDARAJAN, 1982 ; GHASEMZADEH et al., 2010 ; SHIRIN et PRAKASH, 2010**).

Ainsi, l'objectif de notre travail était d'évaluer trois propriétés biologiques de l'HE des rhizomes de gingembre à savoir : activité antimicrobienne, activité anti-inflammatoire et activité antioxydante.

Pour la réalisation de ce travail, nous avons procédé comme suit :

- Extraction de l'huile essentielle de gingembre.
- Analyses physicochimiques et Identification des principaux composants Chimiques de l'huile essentielle extraite.
- Evaluation des activités biologiques.

I. LES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Généralités

Les huiles essentielles, appelée aussi « essences », sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal, elles sont odorantes et très volatiles (**PADRINI et LUCHERONI, 1996**).

Elles sont extraites à partir des feuilles, des fleurs, des fruits, des semences et des écorces (**BRUNETON, 1999**). Elles sont des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**BASTEIN, 2008**).

I.2. Répartition et localisation :

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apeaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae (**MOHAMMEDI, 2006**).

Les huiles essentielles se trouvent au cœur des plantes aromatiques, sous forme d'essence. Elles sont fabriquées par les poils sécréteurs de la plante, les poches ou les cellules sécrétrices. (**FESTY, 2014**). Elles sont localisées dans le cytoplasme de certaines cellules végétales sécrétrices qui se situent dans un ou plusieurs organes de la plante, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface. Ces structures peuvent être des canaux sécréteurs (conifères), des cellules sécrétrices isolées pouvant être épidermiques ou internes, des poils sécréteurs externes ou internes (**MAINEBAU, 1994**).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'HE sont entourées de membranes spéciales constituées d'ester d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des HE ainsi que leur oxydations à l'air (**ANTON et LOBSTEIN, 2005**).

I.3. composition chimiques

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces (**GARNON, 1991**).

I.3.1. Les terpènes

Sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes (**HERNANDEZ et OCHOA, 2005**).

- **Monoterpènes**, formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$) ;
- **Sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$) ;
- **Diterpènes**, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$) ;
- **Tétraterpènes** huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes ;
- **Polyterpènes** (C_5H_8) $_n$ ou n peut-être de 9 à 30.

I.3.2. Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane

Ils sont moins abondants que les composés terpéniques, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane, ce sont souvent des allylphenols, quelque fois des aldéhydes tel l'Eugenol. La Vanilline, l'Anéthole, l'Estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les HE d'apiaceae (anis, fenouil, cannelle, basilic) (**ROUX, 2008**).

I.3.3. les composés d'origines diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatiles qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléiques et les acides linoléique (**PIOCHON, 2008**).

I.4. Propriétés

I.4.1. Physico-chimiques

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes, elles sont généralement :

Liquides et volatiles à température ambiante, et leurs volatilité dépendra de la composition chimique, elles sont plus ou moins colorées, leurs densité est souvent inférieur à 1 (proche de la densité de l'eau), elles sont solubles dans les solvants organiques et dans les matières grasses et insolubles dans l'eau (**KALOUSTIAN et FRANCIS, 2012**), elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont inflammables (**LAURENT et DELERME, 2008**). Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent (**FAYE et al., 1997**).

I.4.2. Biologiques

Les huiles essentielles agissent remarquablement dans à peu près tous les domaines de la santé et de la maladie. Nous pouvons néanmoins dégager un certain nombre de grandes propriétés d'où découlent les indications (**DORMAN et DEANS, 2000 ; WILLEM, 2002 ; LAHLOU, 2004**). Elles sont indiquées comme Tonique digestives, stomachiques, carminatives, aphrodisiaques, antalgiques, anti-inflammatoires (**ZAHALKA, 2015**), antifongiques (**NAIT, 2012**), antibactériennes, antivirales, et antiparasitaires (**WILLEM, 2002**).

Les HE jouent un rôle essentiel pour la plante :

- Protéger la plante contre les prédateurs, insectes, champignons.
- Favoriser la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs (**BRUNETON, 1998**).
- Elles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme des végétaux (**AMIMER, 2005**).

I.5. Conservation

Pour éviter la formation des produits d'oxydation, notamment les peroxydes, il est nécessaire de conserver les huiles essentielles dans des flacons propres et secs, métalliques (aluminium ou acier inoxydable) ou en verre teinté, à l'abri de l'air, et de la lumière, et à froid (4°C) (**KALOUSTIAN et FRANCIS, 2012**). Elles se conservent entre 2 et 5 ans (**MILLET, 2013**).

I.6. Notion de chémotype

La notion de chémotype a été mise en avant dans les années 1970 par le professeur Pierre Franc homme. En effet, une plante élabore des huiles essentielles de composition chimique différente (**COUIC-MARINIER, 2014**). Une même espèce élabore des molécules chimiques différentes en fonction du sol, du climat, de la période de cueillette...etc (**ZAHALKA, 2015**).

Il est important de noter que les HE à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes, mais aussi des toxicités très variables (**PIBIRI, 2005**).

I.7. Méthodes d'extraction

Les huiles essentielles sont obtenues par plusieurs techniques :

1.7.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité (**ZEGHAD, 2009**).

Elle est réalisée dans un appareil de type Clevenger. La matière végétale est introduite dans le ballon réacteur et immergés dans un bain d'eau, Lors de la distillation, les vapeurs d'eau et d'huile essentielle se condensent dans le réfrigérant. L'hydrolat refroidi retourne dans le ballon. La distillation se fait en continu, à la pression atmosphérique. Après l'arrêt du chauffage, puis refroidissement, le volume de l'huile essentielle récupérée est mesuré (Annexe 01) (**KALOUSTIAN et MINAGLOU, 2012**).

1.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal, dans ce cas se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic. La partie inférieure de celui-ci est remplie d'eau. Le niveau de cette dernière doit permettre d'éviter tout contact entre l'eau et la plante (Annexe 01) (**BENJILALI, 2004**).

1.7.3. Hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette

technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (Annexe 01) (**ROUX, 2008**).

I.7.4. Enfleurage

Ce procédé permet d'extraire des composées odorantes fragiles par simple contact avec un corps gras. On obtient ainsi à partir d'une pommade florale un absolu dans lequel l'odeur de la fleur est restituée fidèlement (**MILLET, 2013**).

I.7.5. Extraction par solvants organiques

Cette méthode est pratiquée au niveau industriel et utilise des solvants comme l'hexane, le toluène, les dérivés chlorés. Le solvant est ensuite éliminé par distillation. Elle ne doit pas être employée si l'on veut préparer une huile essentielle à usage thérapeutique car il pourrait rester des traces de solvant (Annexe 01) (**RAYNAUD, 2006**).

I.7.6. Extraction par CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique ou CO₂. Sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état dit « supercritique », intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, le CO₂ présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques (Annexe 01) (**BENETEAUD, 2011**)

I.7.8. Extraction assistée par micro-ondes

C'est une nouvelle technique combinant l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, de refroidissement et de décantation. Certains travaux (**HEMIWIMON *et al.*, 2007**), montrent que cette technique présente de nombreux avantages : gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant et un rendement d'extraction élevé (Annexe 01).

I.7.9. Expression à froid

Pour les agrumes. Il suffit de presser la peau de citron, d'orange, de pamplemousse..., pour récupérer l'essence (Annexe 01) (**FESTY, 2014**).

I.8. Toxicité

Les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe. (**BERNADET, 2000**).

Il convient de ne pas confondre « plantes à huiles essentielles » et « huiles essentielles ». Les posologies devront être respectées quelle que soit la voie d'administration (**RAYNAUD, 2005**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : une DL_{50} comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle.....) ou le plus fréquemment supérieur à 5 g/kg (Camomille, Citronnelle, Lavande, Marjolaine...etc), d'autres ont une DL_{50} inférieure à

1 g/kg. Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**BRUNETON, 1999**).

II. Gingembre (*Zingiber officinale* L.)

II.1. Historique

Le gingembre utilisé depuis plus de 25 siècles dans la formulation d'un grand nombre de remèdes orientaux traditionnels en Chine et en Japon. (BRUNETON, 2002). Le gingembre par la médecine traditionnelle chinoise est une drogue de nature tiède et de saveur piquante. Il se trouve dans les plus anciens textes chinois, dans le « Susruta » ayurvédique sous le nom « Ardraka » en sanscrit « Stringavera » (En forme de corne).

La médecine ayurvédique l'utilisé dans le traitement de la migraine.

Dans l'antiquité, cette épice se vendait déjà à Athènes et à Rome. Au moyen Age, les espagnols la transplantèrent en Amérique centrale (SCHAUENBERG, 2005).

Les indiens ont découvert que les racines de gingembre leurs redonnaient une haleine fraîche et les rendaient ainsi mieux disposés à s'adresser aux dieux, ils s'en servaient aussi en cuisine pour conserver les aliments plus longtemps et pour faciliter la digestion.

L'un des premiers grands herboristes de l'humanité, le Chinois Shen Nung prescrivait le gingembre pour soigner la fièvre, le rhume, le tétanos et la lèpre. Les marins chinois découvrirent de plus que le gingembre les mettait à l'abri du mal de mer.

Les chinois assaisonnaient les fruits de mer de gingembre, considéré comme un antidote à l'empoisonnement. Les femmes quant à elles, buvaient du thé de gingembre pour soulager divers problèmes d'ordre gynécologique.

Les Grecs et les Romains le considéraient comme un excellent produit pour favoriser la digestion.

Les Anglais créèrent la bière de gingembre qui devint avec le temps, le *ginger ale* que l'on connaît maintenant et dont beaucoup de mères se servaient pour guérir la diarrhée, la nausée et les vomissements chez les enfants (JOURDAIN, 1997).

II.2. La famille des Zingibéracées

Il s'agit des plantes condimentaires à rhizome aromatique, originaire des régions tropicales (FOLLIARD, 2014). Ce sont des plantes herbacées vivaces, à Rhizome souterrain muni de racines présentant des tubercules. Ce sont ces rhizomes qui sont le plus souvent utilisés pour parfumer nos assiettes, nous soigner et embellir notre maison, entre autres.

Cette famille comprend environ cinquante genres, et près de mille espèces (CLAIRE PINSON, 2012).

II.3. Dénomination internationale

- **Français** : gingembre
- **Allemand**: ingwer (wurzelstock)
- **Anglais**: Ginger
- **Arabe**: zanjabil, rasafil
- **Chinois** : sang geung
- **Japonais** : shuga, myôga

II.4. Classification botanique

Le gingembre est classé comme suit ((FAIVRE et *al.*, 2006).

Règne : Plantae

Sous règne : Trachéobionta

Division : Magnoliophyta (ou angiospermes)

Classe : Liliopsida

Sous Classe : Zingibéridées

Ordre : Scitaminales ou Zingibérales

Famille : Zingibéracées

Sous-Famille : Zingibéroïdées

Genre : *Zingiber*

Espèce : *Zingiber officinale* L.

II.5. Description botanique

Le gingembre est une plante vivace tropicale herbacée à port de roseau qui mesure jusqu'à 3m de haut.

Son rhizome à croissance horizontale est charnue, irrégulier, allongé (EBERHARD et *al.*, 2005), se présente sous forme de morceaux comprimés latéralement, digités (PHARMACOPEE FRANCAISE, 1989), noueux et parfumé, peau beige pâle, chair jaune pâle juteuse et parfumé. Il devient de plus en plus fibreux avec l'âge, couvert des feuilles écailleuse et pourvu a sa partie inférieure de racines cylindrique.

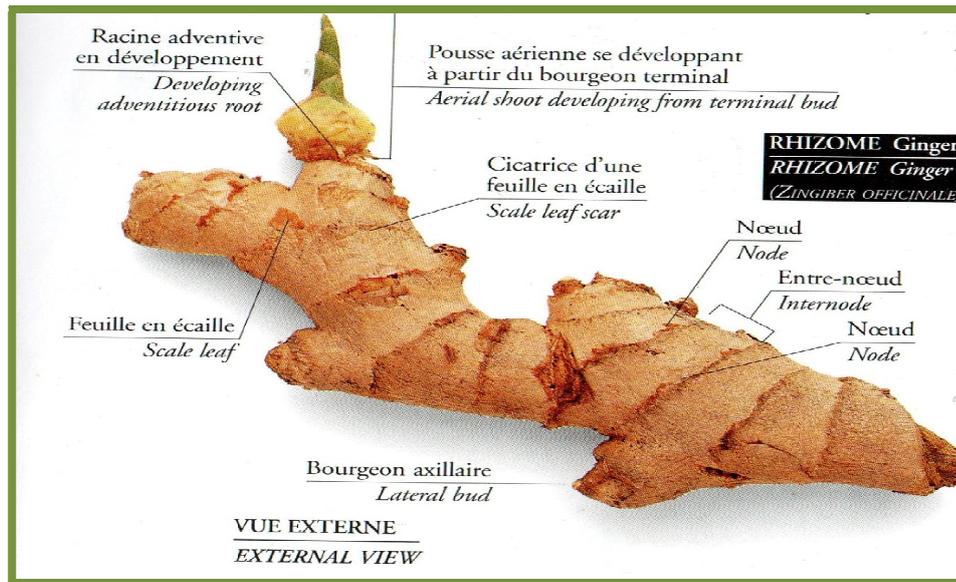


Figure 01: Rhizome frais de Gingembre (*Zingiber officinale* L.) (GALLIMARD, 1992).

Ses feuilles sont persistantes bisériées, longues, étroites, lancéolées, pointues et longues de 20cm. Elle possède deux sortes de tiges :

Certaines de ces tiges sont hautes, stériles et servent à l'assimilation chlorophyllienne, tandis que l'autre sont plus courtes (environ 20 cm) et portent des fleurs irrégulières en épi, vertes puis pourpres, dont les larges labelles sont violets et tachetés de jaune. (SCHAUBENBERG, 2005).

Le fruit est une capsule charnue ressemblant à une baie. Les graines noires enfermées dans des capsules trivalves apparaissent au bout d'une tige couverte d'écailles (EBERHARD et al., 2005).

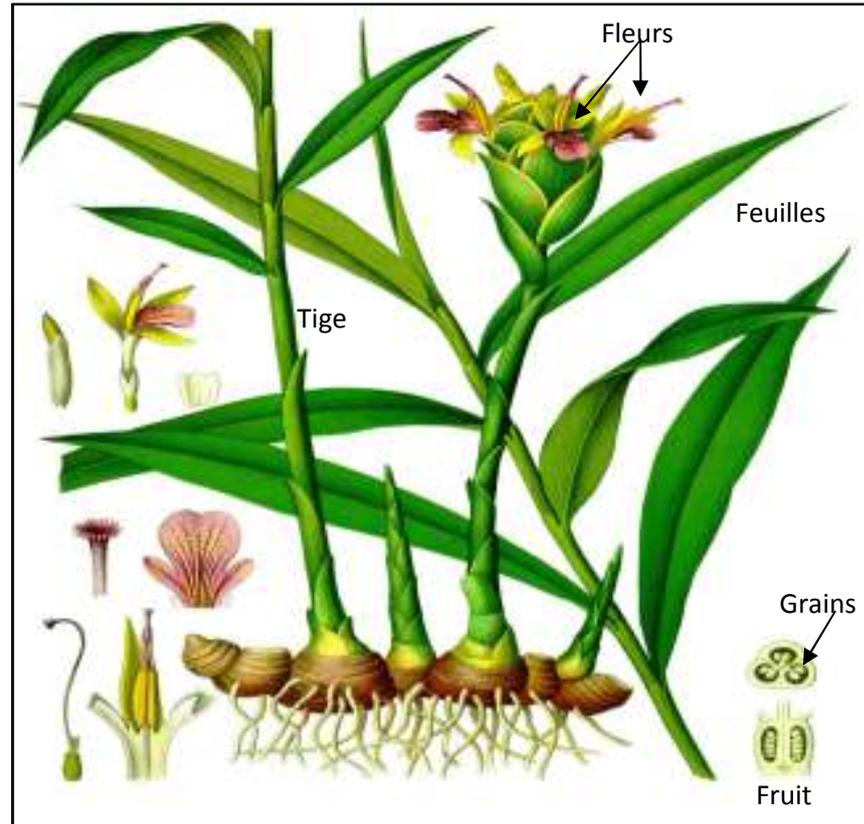


Figure 02: Illustration botanique de *Zingiber officinale* L. (WALTHER et al., 1987).

II.6. Composition chimique

La composition chimique de rhizome du gingembre est variable en fonction de l'origine géographique (BRUNETON, 2002). D'une manière générale, le rhizome est très riche en amidon (60 %), renferme des protéines, des graisses (10 %) (BRUNETON, 1999) et contient une fraction d'huile essentielle (1 à 2 %) de couleur jaune à brune, une Oléorésine (4 à 7,5%), des acides aminés, des acides gras et une enzyme (zingibaine) (BORTEL, 2007).

Il contient aussi des carbures Sesquiterpènes représentant 30 à 70% de l'huile essentielle (alpha-zingibérène- et bêta- bisabolène, bêta- phellandrène, curcumène ...) Oxydes (1.8 cinéole), Monoterpénols, esters (acétate de géranyle) accompagnés d'aldéhydes (citral) et d'alcools monoterpéniques (FOLLIARD, 2014).

Les constituants responsables de la saveur très marquée de la drogue sont des 1-(3'-méthoxy-4'-hydroxy-phényl), Connus sous le nom de [3-6], [8], [10] et [12] -gingérols,. Ils sont accompagnés des cétones correspondantes, de gingerdiols et d'esters, des produits de déshydratation (shogaols). On note aussi la présence de diterpènes labdaniques, galonolactone et dérivé dialdéhydique. Récemment, des diarylheptanoïdes cycliques ont été isolés de drogues chinoises (FAIVRE et al., 2006).

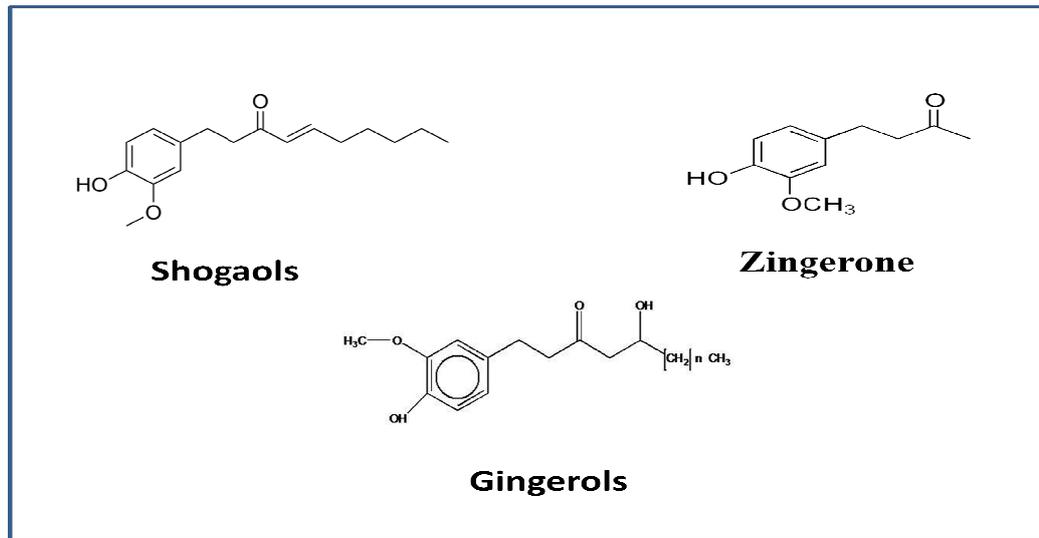


Figure 03: Identification moléculaire des principaux constituants du gingembre Gingerols, Shogaols et Zingerone (**RAVINDRAN et NIRMAL, 2005**).

II.6. Habitat et culture

Le gingembre est originaire d'Asie tropicale du Sud-Est, il est cultivé depuis des siècles en Inde et en Chine (**WICHTL et ANTON, 2003**), il est cultivé sous les tropiques par division du rhizome. Il pousse sur les sols riches et humides. On déterre son rhizome lorsque la plante a atteint 10 mois, Il fleurit de septembre à novembre. (**ISERIN, 2001**).

Sa multiplication se fait par voie végétative, à partir de fragments de rhizome porteurs d'au moins un bourgeon de 5 cm de long (**EBERHARD, 2005**).

II.7. Écologie

La plante exige un climat tropical, une atmosphère très humide, une température relativement stable ainsi qu'un sol léger, riche en humus, suffisamment irrigué et un endroit semi-ombragé. Durant la croissance, ses exigences hydriques sont très importantes (1800 à 2200 mm) aussi bien en volume qu'en régularité. Il demande cependant une courte période de repos ou une petite saison sèche (**EBERHARD, 2005**).

Le gingembre est une plante héliophile qui supporte néanmoins sans souffrir un léger ombrage en plantation mixte (**EURING, 2015**).

II.8. Propriétés Pharmacologiques

Les propriétés stimulantes de cette plante proviennent du gingerol (ISERIN, 2001), Elle pourrait être consécutive à des effets directs sur le système digestif, les gingérols dont des antioxydants et en inhibant la liposygénase et la cycl-oxygénase, sont potentiellement des anti-inflammatoires (BRUNETON, 2002).

Le gingérol et le shogaol contenus dans le rhizome ont un effet antipyrétique et analgésique. (LEROUX, 2007), antirhumatismal, antiasthénique, Stomachique, tonique anti-nauséux, antimigraineux (POINTIS, 2003). HE est également efficace en cas de constipation (LEFIEF, 2012), tonifiante et équilibrante du système nerveux ainsi qu'un Tonique sexuelle (LASSUS, 2014).

Prévention de certains cancers (côlon, intestin, ovaire), de maladies cardio-vasculaires, de la maladie d'Alzheimer et protection des cellules du corps contre le vieillissement. Son principal composé actif est le gingérol qui possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydants (MINKER, 2013).

II.9. Usages traditionnels

• Troubles digestifs

Le gingembre est efficace en cas d'indigestions, de nausées (notamment matinales), de flatulences, de choques et de mal des transports, ainsi qu'en cas d'infections gastro-intestinales (dues à certaines intoxications alimentaires) grâce à ses propriétés antiseptiques.

• Troubles circulatoires

Le gingembre est un remède efficace en cas de dégénérescence des organes et lorsque les extrémités du corps sont mal irriguées, car il améliore la circulation dans les vaisseaux capillaires. Il élève la tension artérielle, et stimule la transpiration et fait tomber la fièvre.

• Troubles respiratoires

Le gingembre soulage la toux et soigne les rhumes, la grippe et autres troubles respiratoires.

« **Sheng jion** » En Chine, on prescrit du gingembre frais en cas de refroidissement, de fièvres, de maux de tête et de douleurs musculaires, et du gingembre sec en cas de «froid intérieur» (mains froides, pouls, faible et visage pâle (ISERIN, 2001).

L'expérimentation a été effectuée au complexe SAIDAL d'EL Harrach dans quatre laboratoires à savoir : le laboratoire des substances naturelles, le laboratoire de microbiologie, le laboratoire de pharmacotoxicologie, et le laboratoire de qualité. Le stage duré cinq mois, allant du mois de janvier au mois de mai 2016.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Notre choix a porté sur les rhizomes frais de gingembre (*Zingiber officinal L.*) appartenant à la famille des Zingibéracées. Les rhizomes ont été achetés au marché (Blida) au mois de janvier. L'identification de l'espèce a été faite au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'EL Harrach.

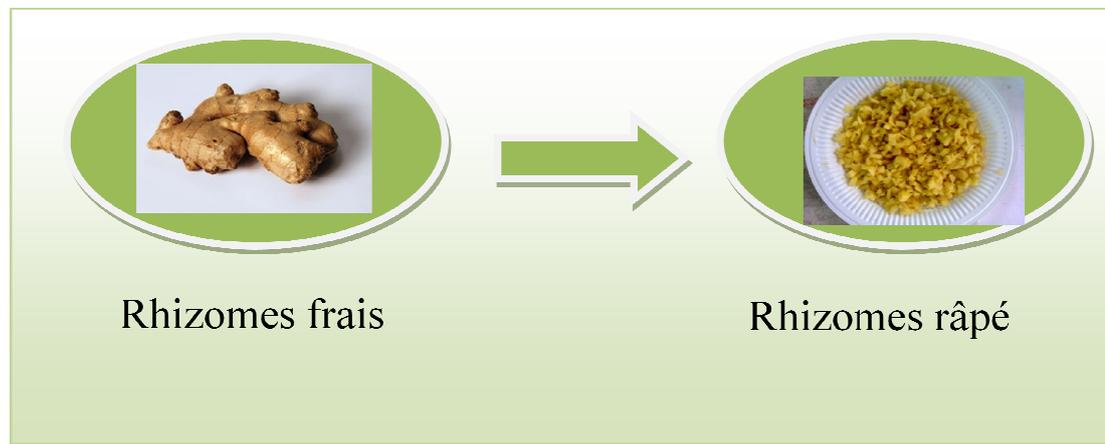


Figure 04 : Rhizomes frais de *Zingiber officinale L.*

I.2. Matériel animal

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée en utilisant 24 souris Albinos (*Mus musculus*) de lignée Swiss, de sexe mâle et dont le poids moyen été de 18 à 22g.

Les animaux ont été fournis par l'animalerie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) d'EL Harrach. Ils ont été hébergés à une température de 20 à 24 °C, leur régime alimentaire repose sur les granulés provenant de l'Office National des Aliments du Bétail (O.N.A.B) et l'eau de robinet.

I.3. Souches microbiennes

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée en testant sept souches microbiennes (quatre souches bactériennes et trois souches fongiques). Les souches utilisées (Tableau 1) ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL, ces dernières ont été produites et développées à l'Institut Pasteur.

Tableau 1: Souches microbiennes utilisées.

	Souches microbiennes	Références	Type de Gram
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Négatif
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Positif
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Positif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Négatif
Champignons	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	-
	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	-

II. Méthodes

II.1. Extraction de l'huile essentielle

La technique de l'hydro-distillation de type Clevenger est utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle à partir des rhizomes frais de gingembre.

Principe

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition (La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes). Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité (Annexe 01) (EI HAIB, 2001).

Mode opératoire

Les rhizomes frais sont lavés et râpés à l'aide d'une râpe de cuisine. 100g de matériel râpé sont introduit dans le ballon du Clevenger, un volume d'eau représentant les deux tiers du volume du ballon est ensuite ajouté avant le début de la distillation et l'ensemble est porté à ébullition. L'extraction dure en moyenne trois heures. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant, condensent et chutent dans une ampoule à décanter. A la fin de la distillation, l'eau et l'huile essentielle récupérée se séparent par différence de densité. Après la séparation des deux phases, l'HE est récupéré et conservée au réfrigérateur à 4°C dans un flacon en verre fermé hermétiquement.

II.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Selon les normes **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée sèche ou humide.

Le rendement (**RHE**) est toujours exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE \%} = (\text{masse de l'huile essentielle en g} / \text{masse de la plante en g}) \times 100$$

II.3. Détermination de la teneur en eau des rhizomes

Ce paramètre est déterminé en utilisant l'appareil de Dean et Stark et le toluène comme solvant (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

Mode opératoire

20g de rhizomes de gingembre frais sont râpés et introduits dans un ballon de 1l surmonté d'un réfrigérant à reflux muni d'un récipient gradué (Annexe 05). 100 ml de toluène sont ajoutés dans le ballon et le mélange est chauffé à reflux jusqu'à ce que le niveau de l'eau reste constant dans le récipient gradué. Après refroidissement, le volume d'eau est noté et la teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$Te = (V/M) \times 100$$

Avec :

Te : Teneur en eau

V : Volume d'eau

M : masse de la matière végétale fraîche

II.4. Détermination des Caractéristiques physico-chimiques de l'HE

II.4.1. Caractéristiques physiques

➤ densité relative

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume de cette substance à 20°C et la masse d'un Volume égal d'eau à la même température (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

Mode opératoire

3 ml d'HE de gingembre et le même volume d'eau distillée sont pesée au moyen d'une balance de précision

La densité relative (d) est donnée par la formule suivante :

$$d = \rho_{HE} / \rho_{eau}$$

ρ : la masse

➤ Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'indice d'un rayon lumineux dans l'air et le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

Mode opératoire

Deux à trois gouttes d'huile essentielle extraite sont placées dans la cellule de mesure jusqu'au trait signal de réfractomètre qui doit être au centre de la cellule. La valeur de l'indice de réfraction est directement lue sur le cercle gradué.

II.4.2. Caractéristiques chimiques

➤ Indice d'acide

Indice d'acide (I_A) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de substance (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

Mode Opérateur

Une masse de 0,3123g de l'HE du gingembre est dissoute dans 25ml d'un mélange à volume égale d'alcool et d'éther. Le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1M en présence de 0,5ml de solution de phénolphthaléine. Après dissolution, le titrage est fait par 0,1M d'hydroxyde de potassium jusqu'à l'obtention d'une coloration rose.

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

$$(I_A) = 5,61 \times n / m$$

Avec :

5,61 : constante

n : Volume de KOH consommé

m : Masse de l'échantillon.

➤ Indice de saponification

Indice de saponification (I_S) est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1 g de substance (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

Mode Opérateur

0.5g d'HE sont introduites dans une fiole de 250ml munie d'un réfrigérant à reflux. 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique à 0.5M et quelques billes de verre sont ajoutées et la solution est chauffée à reflux pendant 30min. 1ml de phénolphthaléine est ajouté puis la solution est titrée immédiatement par l'acide chlorhydrique 0.5M.

Un essai à blanc (sans l'HE) est réalisé dans les mêmes conditions.

L'indice de saponification (I_S) est donné par la formule suivante :

$$I_S = 28,05 \times (n_1 - n_2) / m$$

n_1 : Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation de l'échantillon ($n_1=23$).

n_2 : Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation de blanc ($n_2= 28,8$).

m : masse de l'échantillon.

➤ **Indice d'ester**

Indice saponification des esters présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification (I_S) et l'indice d'acide (I_A) selon la formule suivante (**PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2010**).

$$I_E = I_S - I_A$$

Avec :

I_E : Indice d'ester.

I_S : Indice de saponification.

I_A : Indice d'acide

➤ **La miscibilité dans l'éthanol**

Une huile est dite miscible dans « n » volume ou plus d'alcool d'un titre donné « t », Si la solution limpide dans « n » volume, demeure limpide comparée à l'huile essentielle non diluée, après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool, avec une température de ($20 \pm 0,2^\circ\text{C}$)

Mode Opératoire

1 ml d'HE du gingembre sont mélangés avec 8 ml d'éthanol (l'ajout de l'éthanol se fait progressivement par des quantités identique égale à 1 ml) et agitation à chaque fois.

II.5. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

L'identification des principaux composants de l'huile essentielle extraite à partir des rhizomes de gingembre frais a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Annexe 06).

L'analyse a été réalisée au niveau du laboratoire physicochimique de l'Université des Sciences Technologiques Houari Boumediene.

Mode opératoire

Le chromatographe en phase gazeuse est du type *Perkin Elmer*. La chromatographie est une technique couramment utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques. Elle consiste à séparer les composés d'un mélange en fonction des vitesses d'entraînement à travers une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile gazeuse (gaz vecteur) (Arpino et al., 1995).

Les conditions opératoires sont classées dans le tableau suivant :

Tableau 2: Conditions opératoires de la CPG

Paramètre	Type et caractérisation
Courant d'ionisation	70 ev
Colonne capillaire	Carbowax
Longueur	30 m
Diamètre interne	0.32 mm
Epaisseur de phase	0.32 µm
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1,5 ml / min
Pression en tête de colonne	356 mbar
Température de l'injecteur	250°C
Programmation du four	60°C à 220°C (4°C/min)
Concentration des échantillons	Pure
Quantités injectée	1µl
Mode d'injection	Split

III. Evaluation des activités biologiques

III.1. Activité antimicrobienne

Principe

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite à partir des rhizomes frais de gingembre a été réalisée en utilisant deux techniques différentes:

- Technique de contact direct en milieu solide ou diffusion sur gélose (méthode de l'aromatogramme).
- Technique de contact indirect ou micro-atmosphère.

III.1.1. Aromatogramme

Principe

La technique consiste à déposer un disque absorbant stérile de 9 mm imprégnés d'huile essentielle sur une gélose inoculée de souches microbiennes et de mesure de la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. L'absence de croissance microbienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (exprimé en mm) (HAYES et MARKOVIC, 2002).

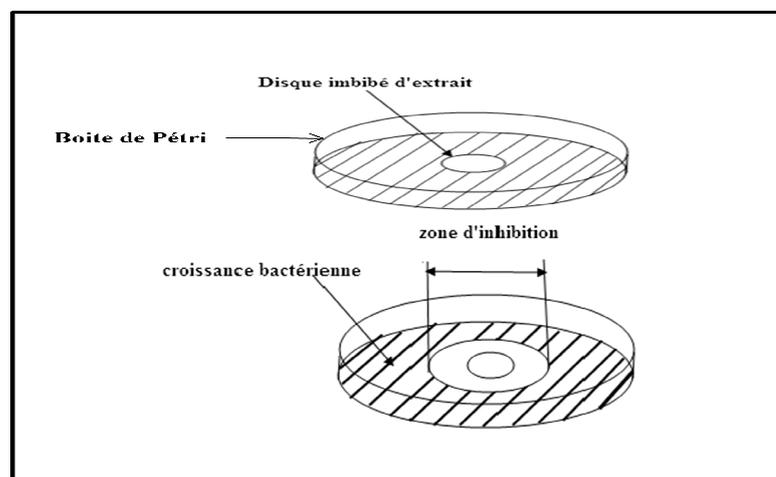


Figure 05 : Méthode de la diffusion sur gélose (ZAIKA, 1988).

Mode opératoire

Conformément aux travaux réalisés par AIT ELHADJ et SAADOU (2003), nous avons procédé aux préparations suivantes :

- **Préparation de la première couche (couche support)**

Deux milieux de culture solides sont utilisés, à savoir ; la gélose nutritive (pour la culture des bactéries) et le milieu Sabouraud (pour la culture des champignons)

Les milieux de culture sont coulés aseptiquement (devant la flamme d'un bec benzène) dans des boîtes de pétrie de 90 mm de diamètre à raison de 15ml par boîte.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum est préparé à partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et de 48 heures pour les champignons. Pour chaque souche microbienne, 4 à 5 colonies bien distinctes sont prélevées et introduites dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Les suspensions microbiennes sont obtenues après agitation au vortex.

- **Préparation de la deuxième couche**

Les deux milieux de culture (gélose nutritive et milieu sabouraud) sont liquéfiés dans un bain marie à 42°C et distribués dans des flacons à raison de 40ml par flacon.

Nous obtenons sept flacons au total correspondant aux sept souches microbiennes que nous avons testé (4 souche bactériennes et 3 souches fongiques).

Les sept flacons sont inoculés par 200 µl de chaque suspension microbienne à raison d'une souche par flacon, le tout est agité manuellement.

4 ml de chaque milieu de culture inoculée sont déposés à la surface de la première couche de gélose solidifié (couche support) en l'étalant immédiatement.

- **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, des disques stériles de 9 mm de diamètre sont plongés dans l'HE pure jusqu'à imprégnation totale, puis déposés sur la surface du milieu gélosé contenant la souche à tester. Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paille pendant 30 min

pour permettre la diffusion de l'HE dans la gélose, puis incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour la culture des bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons.

III.1.2. Microatmosphère

Dérivé de la méthode précédente, le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celui des aromagrammes, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'HE.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé (Figure 05) Cette méthode repose donc sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de l'HE à une température d'incubation donnée (SARBACH, 1962 ; DIDRYET al., 1993 ; BILLERBECK, 2000).

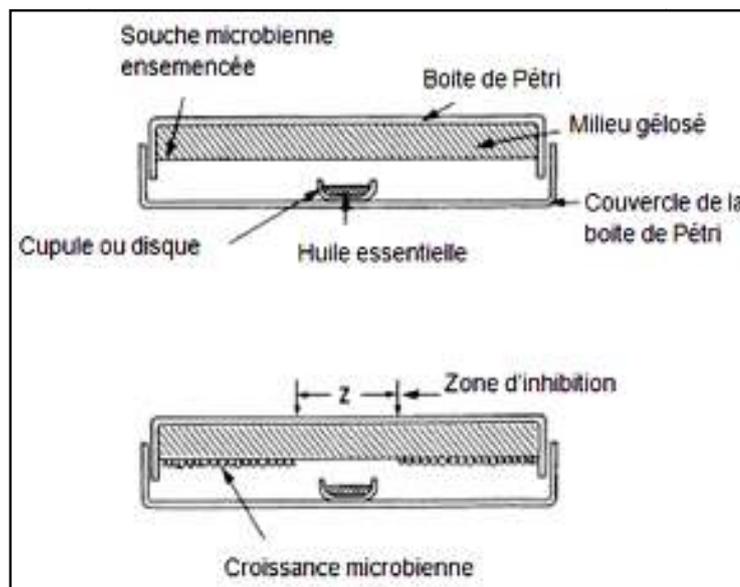


Figure 06: Méthode de microatmosphère (ZAIKA, 1988).

Mode opératoire

- **Préparation des milieux de culture**

Les milieux de culture (Muller Hinton et sabouraud) liquéfiés au bain marie sont coulés aseptiquement (devant la flamme d'un bec benzène) dans des boîtes de pétrie de 90

mm de diamètre à raison de 15ml par boîte. Ces dernières sont laissées sur la paillasse jusqu'à solidification de la gélose.

- **Ensemencement**

Les suspensions microbiennes déjà préparées pour la technique de diffusion sur gélose sont utilisées pour l'ensemencement des boîtes de Pétri contenant les milieux de culture approprié, l'ensemencement se fait par écouvillonnage.

L'écouvillon stérile est trempé dans la suspension microbienne à tester, l'étalement de cette dernière se fait en stries serrées sur la gélose en faisant pivoter la boîte de Pétri horizontalement à 60° pour couvrir toute la surface. Les boîtes sont laissées sur la paillasse pendant 30 minutes pour permettre la diffusion de la suspension microbienne dans la gélose puis elles sont retournées (couvercle en bas).

- **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, des disques stériles de 9 mm de diamètre sont plongés dans l'HE pure jusqu'à imprégnation totale, puis déposés délicatement au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri ensemencée puis incubées (couvercle en bas) dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons.

III.1.3. Lecture des résultats

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les abaques de lecture conformément aux normes de l'échelle estimés par **MUTAI et al. (2009)**.

- Très fortement inhibitrice $ZI \geq 30\text{mm}$
- Fortement inhibitrice $21\text{ mm} \leq ZI \leq 29\text{mm}$
- Modérément inhibitrice $16\text{ mm} \leq ZI \leq 20\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice $11\text{mm} \leq ZI \leq 16\text{mm}$
- Non inhibitrice $ZI \leq 10\text{ mm}$

III.2. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des rhizomes frais du gingembre a été réalisée en utilisant la méthode de (LEVY, 1969).

Nous avons testé l'effet anti-inflammatoire de l'HE extraite à partir des rhizomes frais du gingembre ainsi que celui de l'hydrolat (eau florale) sur des lots de souris.

Principe

Le principe consiste à provoquer un gonflement de la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire (Carraghénine) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en comparant, à la fin de l'expérience (après 4 heures), le poids (en gramme) des pattes droites et gauches des souris provenant de différents lots (Témoin, référence (Dichlofénac), HE et hydrolat).

Mode Opératoire (Annexe 04)

Constitution de 4 lots de souris à raison de 6 souris par lot :

_ Au T₀

Administration aux 4 lots par voie orale, à l'aide d'une sonde gastrique les suspensions suivantes :

- lot témoin négatif : gavage des souris par 0,5ml d'eau distillé.
- lot témoin positif (de référence) : gavage des souris par 0.5ml de Dichlofénac (médicament de référence).
- lot essai 1 : gavage des souris par 0,5ml de l'huile essentielle de gingembre à 1% (diluée dans le TWEEN 80).
- lot essai 2 : gavage des souris par 0,5ml de l'hydrolat de gingembre.

_ Au T₀+ 30 min

L'inflammation a été produite chez tous les animaux par l'injection d'une solution de Carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche à raison de 0,025ml par souris.

_ Au T₀ + 4heures

Les animaux sont anesthésiés avec l'éther puis sacrifiés. Les deux pattes postérieures (gauche et droite) sont coupées à hauteur de l'articulation et pesées sur une balance analytique.

➤ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en calculant:

- des moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite pour chaque lot.
- Du pourcentage d'augmentation des poids de la patte (%d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{Moyenne du poids des pattes gauches} - \text{Moyenne des poids des pattes droites}}{\text{Moyennes du poids des pattes droites}} \times 100$$

- Du pourcentage de réduction des poids de la patte par la formule suivante :

$$\% \text{ de Réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème (Témoin négatif)} - \% \text{ de l'œdème (Essai)}}{\% \text{ de l'œdème (Témoin négatif)}} \times 100$$

III.3. Activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de l'huile essentielle de gingembre a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2 -diphényl - 1- picrylhydrazyl) décrite par **CHEN et al., (2004)**.

Principe

La capacité de donation des électrons par les HE est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution alcoolique contenant le radical libre DPPH⁺ (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) (**BURITS et BUCAR, 2000**).

Mode opératoire

Nous avons suivie les étapes suivantes (MANSOURI *et al.*, 2011):

- La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol.
 - Un volume de 100µl d'huile essentielle est dilué dans 4ml de méthanol, c'est la solution mère, à partir de laquelle nous réalisons une série des dilutions pour avoir la concentration de 0.2, 0.5, 0.7, 0.9 et 1%.
 - 2ml de la solution de DPPH sont ajoutés dans chaque dilution.
 - Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité.
 - Les absorbances sont mesurées à 517nm contre le blanc (solution DPPH/méthanol).
 - La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol.
- L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence.

III.3.1.Expression des résultats

III.3.1.1.Calcul des pourcentages d'inhibitions

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\% \text{ Activité antioxydante} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm.

III.3.1.2.Calcul de la concentration inhibitrice IC₅₀

Le IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % de radicaux libres (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Plus la valeur de IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est élevée. (SHARIFAR ET *al.*, 2007).

I. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation des rhizomes frais de gingembre est de 1.42%.

BLUNDENI et al. (2007) ont rapporté que le rendement en HE des rhizomes de gingembre frais se situent entre 1 et 3%. Un rendement de 2.4% a été obtenu par **SASIDHARAN et MENON (2010)** et **CHIDOZIE (1999)**, alors que pour **MARTIN et al. (2005)** le rendement a été de 0.9% et pour **DIEUMOU et al. (2009)** a été de 0.17%.

Le rendement que nous avons obtenu (1.42%) semble moyen comparé au rendement mentionné dans la littérature en utilisant la même technique d'extraction (l'hydrodistillation).

D'après **MARZOUKIA et al. (2009)**, **APROTOSOAIIE et al. (2010)** et **DJARRI (2011)**, le rendement en huile essentielle dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce végétale, la situation géographique, la période de récolte, les pratiques culturales, la méthode d'extraction et d'autres facteurs...

II. Teneur en eau

La teneur en eau des rhizomes frais de gingembre obtenue est de 85%. Ce résultat montre que le gingembre frais est très riche en eau et concorde avec les valeurs indiquées dans la littérature **BARTLEY et JACOBS (2011)** et dans la **PHARMACOPEE EUROPEENNE (2010)**.

III. Caractérisation de l'HE

III.1. Caractéristiques organoleptiques

L'HE extraite à partir des rhizomes frais de gingembre (*Zingiber officinale* L.) avait un aspect liquide mobile de couleur jaune, une odeur épicée, fraîche et légèrement citronnée avec une saveur brûlante épicée.

Les mêmes caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de gingembre sont rapportées par **OTMANINE (2010)** et la norme **AFNOR (2000)**.

III.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats de la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle de gingembre sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 03: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de gingembre.

Tests	Résultats	Résultats obtenus par d'autres auteurs
Indice de réfraction	1.49	1.49 : PHARMACOPEE EUROPEENNE (2010) , 1.47 : OTMANINE (2010)
Indice d'acide	0.159	1.4025 OTMANINE (2010)
Densité relative	0.864	0.834 OTMANINE (2010) 0.877 : BARTLEY (2011)
Indice de saponification	178,125	179,0712 : OTMANINE (2010)
Indice d'ester	177,966	177.614 : OTMANINE (2010)
pH	5.5	4,6 à 6 : EUGENE (2009) 6,5 : OTMANINE (2010)

Les résultats des tests physico-chimiques (Indice de réfraction, Indice d'acide, densité relative, Indice de saponification, Indice d'ester) concordent avec ceux trouvés par d'autres auteurs cité ci-dessus.

Il n'existe pas de normes de la **PHARMACOPEE EUROPEENNE** pour l'HE de gingembre sauf pour l'indice de réfraction (1,49) qui concorde avec le résultat que nous avons trouvé.

III.3. Composition chimique

Les principaux composants chimiques de l'HE de *Z. officinale* identifiée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 04: Composition chimique de l'huile essentielle de *Z. officinale* extraite par hydrodistillation (CPG)

Nom	Temps de retention (min)	%
Ocimene (monoterpènes acycliques)	12.11	5.22
Camphene (monoterpènes bicycliques)	14.05	5.31
Farnesol (alcool sesquiterpène)	16.16	3.66
β-bisabolène (sesquiterpène monocyclique)	17.12	4.34
Curcumene (sesquiterpènes hydrocarbonés)	17.43	7.14
z-citral (Aldéhyde monoterpénique)	18.87	8.11
Farnésène (sesquiterpènes bicyclique)	20.74	6.83
Sesquiphellandrene (sesquiterpènes hydrocarbons)	21.01	7.92
e-citral (aldéhydes monoterpéniques)	21.61	11.12
Zingiberene (sesquiterpènes hydrocarbonés)	21.68	17.95

La CPG a identifié dix principaux composants de l'HE de gingembre (Tableau 4, figure 06). Le zingibérène est le composant majoritaire avec une teneur de 17,75% suivi par e-citral (11,12%), z-citral (8,11%), sesquiphellandrene (7.92%), ar-Curcumene (7.14%), Farnésène (6.83%), Camphene (5.31%), Ocimene (5.22%), β -bisabolène (4.34%), Farnesol (3.66%),

De plus, la composition chimique, par famille, de l'HE du gingembre nous a révélé que cette HE est caractérisé par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés et par les sesquiterpènes hydrocarbonés.

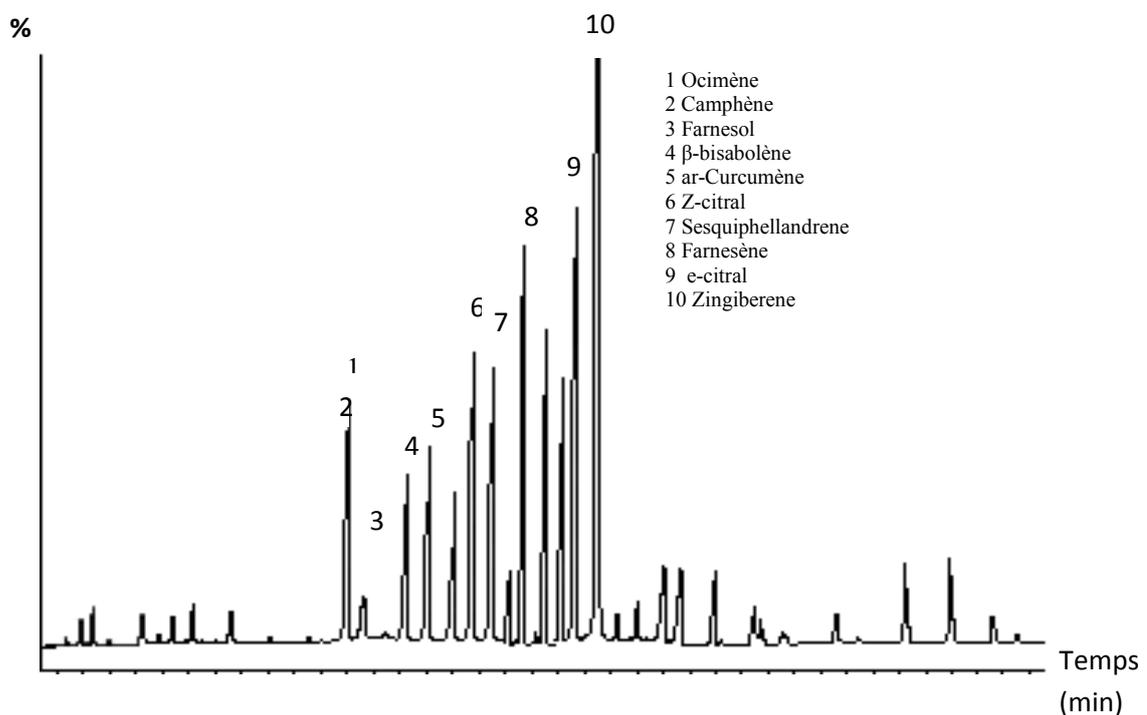


Figure 07 : Chromatogramme de l'huile essentielle de gingembre (CPG)

Les résultats rapportés par la littérature, dont ceux de **DIEUMOU et al. (2009)** au Camerone ont identifié 26 composants, dont le Camphène (11.9%), B_myrcène (1.7%), Z-citral (8.2%), Geraniol (2.6%), ar-curcumène (2.5%), Germacrène (0.8%), Zingibérène (14%). Une étude récente, publié par **BARTLEY et JACOBS (2011)** a révélé que le Zingibérène était le composé majoritaire de l'HE extraite a partir des rhizomes frais de gingembre avec un taux de (22.2%) suivie par la ar-curcumène (13.3%). Un autre travail publié par **NGASSOUMET et al. (2005)** a révélé aussi la prédominance du neral, geranial, zingiberene, E- β -farnesene et un taux de (3,61%) de zingiberène.

En revanche, d'autres équipes **JORGE et al. (2011)** ont rapportés que l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des rhizomes de *Zingiber officinale* qui ont été récoltés dans la région de Cuba, a été caractérisée par la présence d'ar-curcumène (22,1%), zingibérène (11,7%), β -bisabolène (11,2%) et cadine-1,4-diène (12,5%). D'après **GALLON (2014)** les analyses ont montré que les principaux constituants pour *Z.officinale* étaient les Sesquiterpènes (Zingibérène (30%), béta- sesquiphellandène (15%), ar-curcumène (10%), béta-bisabolène (7%), alpha-farnésène (7%)) et les Monoterpène (camphène(4%). %). Par ailleurs une autre équipe **HASAN et al. (2012)** a analysé l'HE extraite à partir des rhizomes frais de gingembre qui ont été recueillies de Malaysia, et a établi la prédominance de sept composants principaux la plupart d'entre eux étaient des hydrocarbures sesquiterpéniques parmi eux zingiberene (6% à 9%), bisabolène β - (4% à 5%), α -farnesne (7% à 11%), β -sesquiphellandrene (9% à 13%), des hydrocarbures monoterpéniques qui est ar-curcumène (0% à 14 %) et des composés phénoliques qui sont gingerol (23% à 25%) et shogaol (25% à %).

Cette différence de composition est toute à fait attendue, parce que d'après **SVOBODA et HAMPSON (1999)** elle est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température, la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction.

IV. Evaluation des activités biologiques

IV.1. Activité antimicrobienne

IV.1.1. Aromatogramme

L'activité antimicrobienne de notre huile est estimée en termes de diamètre des zones d'inhibition (exprimé en mm) autour des disques contenant le produit à tester vis-à-vis de sept germes pathogènes (*Echerichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cereviceae*, *Aspergillus niger*). Les résultats figurent dans le tableau suivant et sont illustrés par la figure 9.

Tableau 05 : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) de la croissance des différentes souches microbiennes en présence de l'HE des rhizomes frais de gingembre *Zingiber officinale* par la méthode de l'aromatogramme.

	Souches microbiennes	Diamètres des zones d'inhibition	Interprétation (selon Mutai et al., 2009)
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	11.5 mm	11mm ≤ DZI ≤ 16mm Légèrement inhibitrice
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25 mm	21 mm ≤ DZI ≤ 29mm Fortement inhibitrice
	<i>Bacillus subtilis</i>	34 mm	D ≥ 30mm très fortement inhibitrice
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Non inhibitrice D ≤ 10 mm
Champignons	<i>Candida albicans</i>	21 mm	21 mm ≤ DZI ≤ 29mm Fortement inhibitrice
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	23 mm	21 mm ≤ DZI ≤ 29mm Fortement inhibitrice
	<i>Aspergillus niger</i>	14 mm	11mm ≤ DZI ≤ 16mm Légèrement inhibitrice

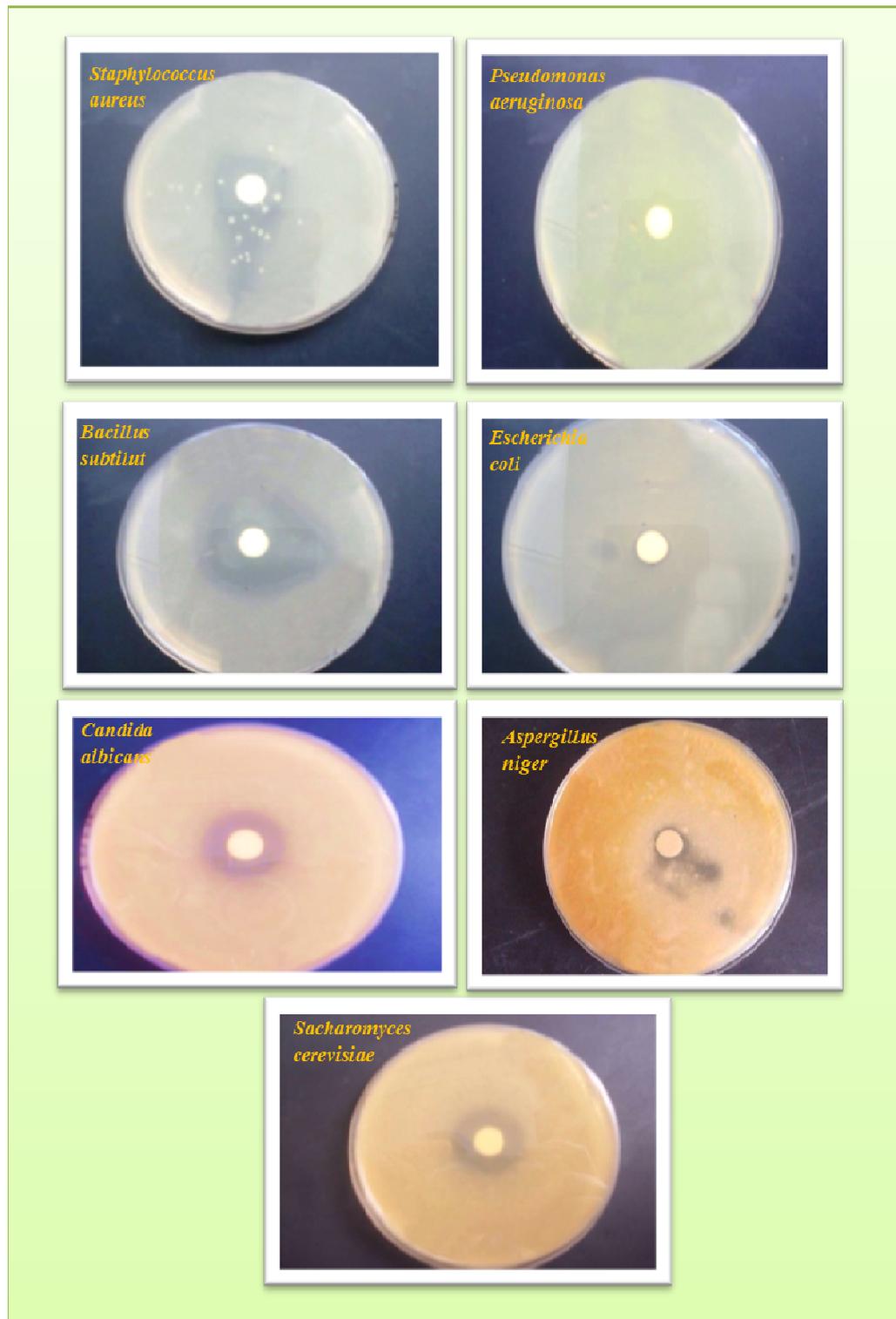


Figure 08 : Effet inhibiteur de l'HE de rhizomes de gingembre sur les souches microbiennes testées par la méthode de l'aromatogramme.

L'analyse des résultats du tableau 5 et des figures ci-dessus montrent que l'HE a inhibé la croissance de toutes les souches microbiennes testées (*Esherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui semble résister à l'action de l'HE. Néanmoins, l'activité inhibitrice de l'HE de gingembre (quand elle existe) est variable selon la souche testée.

En effet le développement de *Bacillus subtilis* est très fortement inhibé (ZI= 34mm) par l'HE alors que *Staphylococcus aureus* (ZI= 25mm), *Sacharomyces cerevisiae* (ZI= 23mm) et , *Candida albicans* (ZI= 21mm) sont fortement inhibées. Enfin, *Aspergillus niger* (ZI= 14mm) et *Esherichia coli* (ZI= 11.5) sont légèrement inhibées.

L'activité inhibitrice de l'HE semble être plus importante par les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*). D'après **ABDUL RAHMAN et al. (2010)** les bactéries à Gram positif possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles. Au contraire, la croissance des bactéries à Gram négatif semble moins (*Esherichia coli*) ou pas (*Pseudomonas aeruginosa*) inhibée par l'HE.

Plusieurs chercheurs **SASIDHARAN et MENON (2010)** ; **ALI HASAN et al. (2012)** en testant l'HE de gingembre sur des souches microbiennes, ont rapportés des résultats qui sont en accord avec nos résultats concernant la sensibilité des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. D'autre part, **SOUZA et al. (2006)** ; **DERWICH et al. (2010)** ; **BARI et al. (2010)** ; **INOUYE et al. (2001)** ; **BAGAMBOULA et al. (2004)** ont confirmés la grande résistance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif. D'après ces auteurs ce constat pourrait être dû à la présence, chez les bactéries à Gram négatif, des lipopolysaccharides (LPS) qui pourraient fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule.

GOETZ et GHEDIRA (2012), rapportent que L'huile essentielle de gingembre est parmi les huiles qui ont le plus important pouvoir antibactérien, il inhibe la croissance bactérienne, et l'activité observée serait due principalement aux effets combinés de plusieurs composants minoritaires.

Selon **COSENTINO et al. (1999)** et **GULFRAZ et al. (2008)** l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, est assignée aux terpénoïdes et aux composés phénoliques. D'après **BAUDOUX (2000)** ; **OHNO (2003)** parce que l'huile essentielle de

gingembre contient des phénols et du linalol, elle entraîne notamment des lésions irréversibles sur les membranes des bactéries. Elle exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les travaux de **DORMAN (2000)** et **OUSSALAH et al. (2007)** montrent que la présence d'une teneur importante de monoterpènes oxygénés (camphène) dans l'huile essentielle de *Zingiber officinale* peut être responsable de son activité prononcée contre *Staphylococcus aureus* et sa haute activité contre *Bacillus subtilis*. En effet. Il a été démontré que le *Staphylococcus aureus* est le plus affecté par les monoterpènes cétones.

IV.1.2. Microatmosphère

La méthode de micro atmosphère nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobienne de l'HE du Rhizome de Gingembre vis-à-vis sept souches. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le tableau suivant et sont illustrés par la figure 10.

Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) de la croissance des différentes souches microbiennes en présence de l'HE des rhizomes frais de gingembre *Zingiber officinale* par la méthode de microatmosphère.

Souches microbiennes		Diamètres des zones d'inhibition	Interprétation (selon Mutai et al., 2009)
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	–	Non inhibitrice D ≤ 10 mm
	<i>Staphylococcus aureus</i>	33 mm	D ≥ 30mm très fortement inhibitrice
	<i>Bacillus subtilis</i>	55 mm	D ≥ 30mm très fortement inhibitrice
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	Non inhibitrice D ≤ 10 mm
Champignons	<i>Candida albicans</i>	19 mm	16 mm ≤ DZI ≤ 20mm Modérément inhibitrice
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	15 mm	11mm ≤ DZI ≤ 16mm Légèrement inhibitrice
	<i>Aspergillus niger</i>	–	Non inhibitrice D ≤ 10 mm

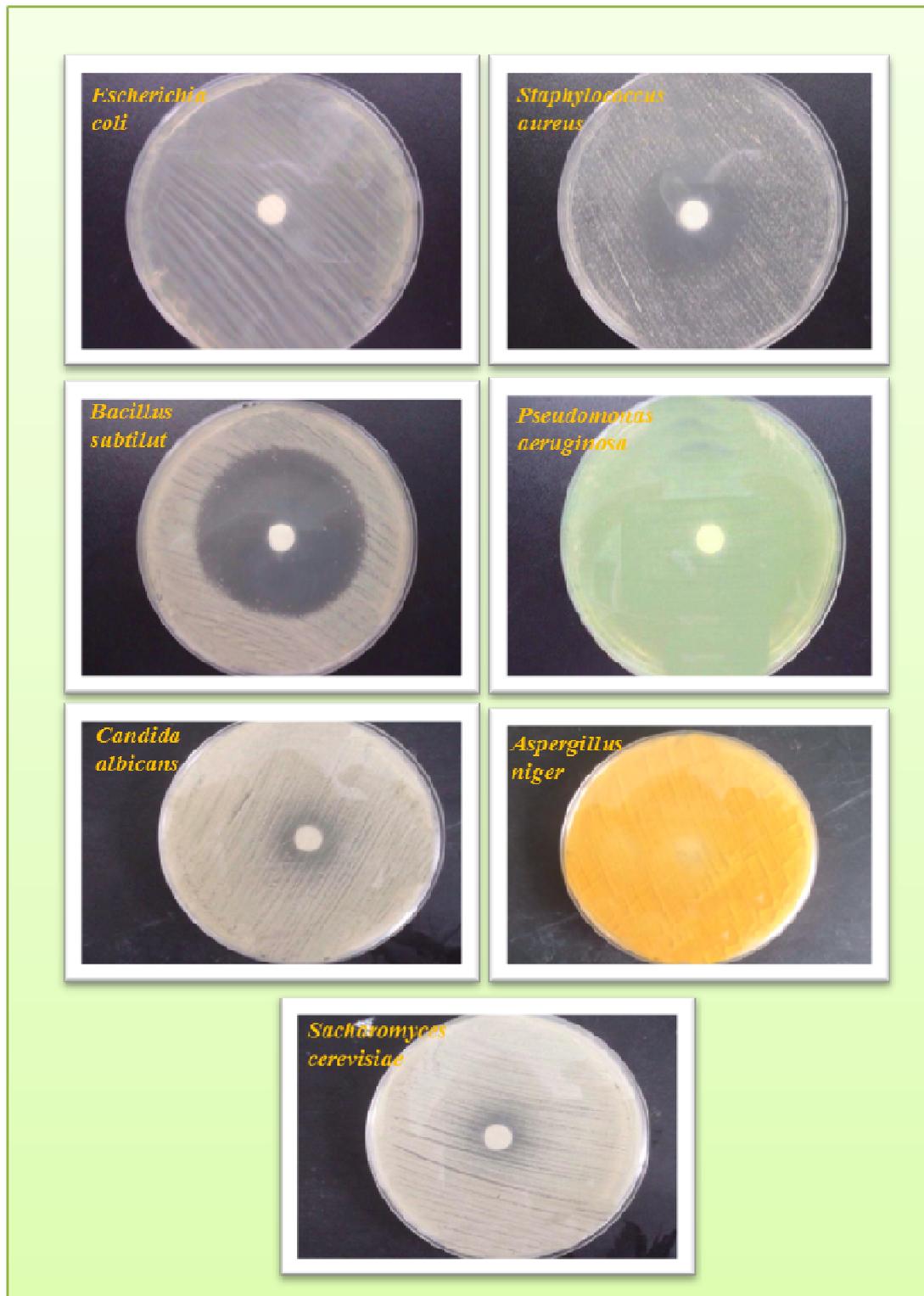


Figure 09 : Effet inhibiteur de l'HE de rhizomes de gingembre sur les souches microbiennes testées par la méthode de la microatmosphère.

L'analyse des résultats montrent que la fraction volatile de l'HE de gingembre inhibe la croissance microbienne des souches testées à l'exception de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus nige*.

L'activité de cette fraction volatile s'est montrée très fortement inhibitrice surtout sur *Bacillus subtilis* (ZI= 55mm) suivie par *Staphylococcus aureus* (ZI= 33mm). Alors qu'elle est modérément inhibitrice pour *Candida albicans* (ZI= 19mm) et légèrement inhibitrice (ZI= 15mm) sur *Sacharomyces cerevisiae*.

La littérature n'a pas rapporté des résultats concernant l'utilisation de la fraction volatile de l'HE de gingembre pour empêcher le développement microbienne.

IV.2. Activité anti-inflammatoire

Les résultats concernant l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'HE et l'hydrolat des rhizomes de gingembre sont mentionnés dans le Tableau (Annexe 03)

Illustrés par la figure suivante :

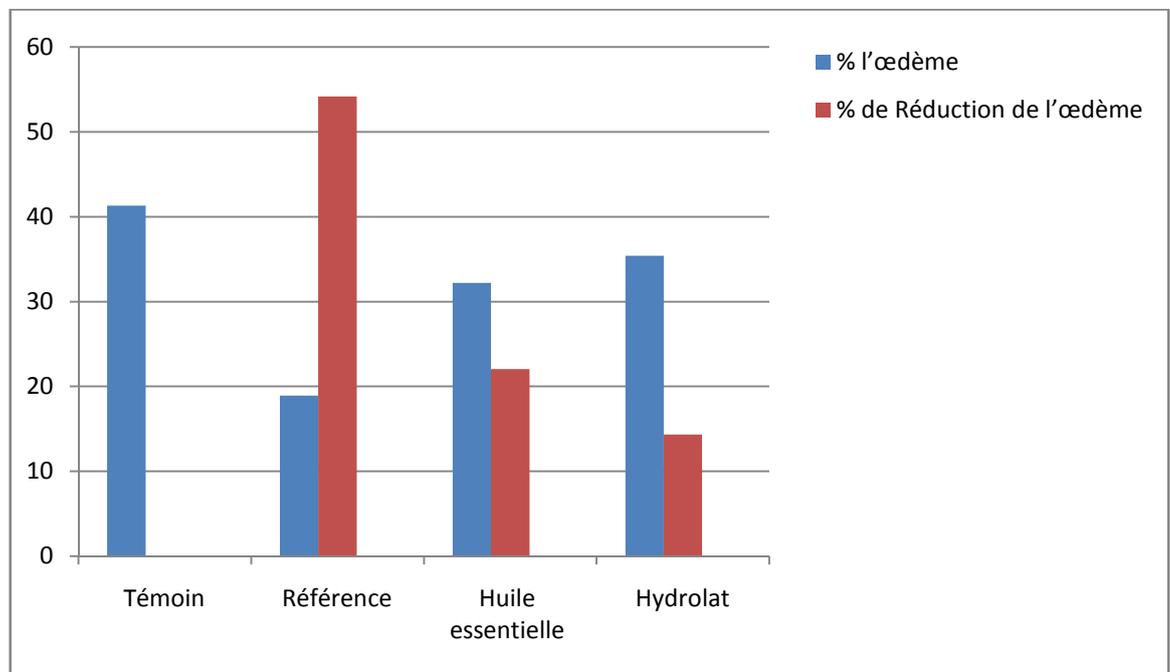


Figure 10: variation des pourcentages de l'œdème et pourcentage de Réduction de l'œdème chez les souris en fonction des différents traitements.

L'analyse des résultats montre :

Après injection de la carraghénine, le pourcentage d'augmentation de l'œdème est variable dans les quatre lots de souris. En effet nous remarquons que l'œdème est plus important (42,32%) chez les animaux non traités (témoignage) par rapport aux animaux traités aussi bien par l'HE (32,39%) et l'hydrolat (35,39%) de la plante que chez les animaux traités par le médicament de référence (D.chlofénac) (18,94%). Les différents traitements (HE, hydrolat et D. chlofénac) administrés avant l'injection de la carraghénine ont diminué l'ampleur de l'œdème. Ils semblent avoir inhibé la carraghénine.

De l'analyse de la figure ci-dessus, il apparaît que le pourcentage de la réduction d'œdème des souris traitées par l'HE (22,04%) et l'hydrolat (14,55%) reste inférieur au pourcentage obtenu après traitement par le Dichlofénac (54,16%). Ni au moins la réduction de l'œdème par traitement avec l'HE (22,04%) est plus importante que celle obtenu par traitement avec l'hydrolat (14,55%).

De ces résultats, il en ressort que l'HE et l'hydrolat des rhizomes frais de *Zingiber officinale* présente une activité anti-inflammatoire qui reste faible comparé à celle donnée par médicament de référence.

Donc notre échantillon d'HE des rhizomes frais de gingembre à 1% possède bien une activité anti-inflammatoire par rapport à l'hydrolat.

Les travaux de **RAJI et al. (2002)**, ont montrés que l'HE de gingembre inhibe de manière significatif la carraghenine injectée dans les pattes des souris et de se faite inhibé l'œdème. Ces résultats concordent avec nos résultats qui ont montrés des % d'œdèmes moins importants chez les souris traitées avec l'HE et l'hydrolat.

BADRELDINE et al. (2007) ont démontrés que le gingembre contient des constituants (gingerdiones) qui ont une double action anti-inflammatoire, alors que l'HE réduit l'inflammation induite par la carraghénine. Ils ont indiqués que les mécanismes d'action des composés de l'HE de gingembre comme le gingerol et leurs dérivés sont partiellement responsables de l'activité anti-inflammatoire en inhibant la carraghénine.

Ces résultats pourraient expliquer la faible activité anti-inflammatoire de notre HE. De même **LANTZ et al. (2007)** en utilisant un essai *in vitro* pour tester l'activité anti-inflammatoire des composés isolés à partir des rhizomes de gingembre. Ils ont montré que ces composés actifs des rhizomes de *Zingiber officinale* (gingerols et shogaols) ont été censés

avoir des actions anti-inflammatoires ça veut dire ils ont une capacité de réduire l'inflammation provoqué par la carraghénine , alors qu'ils ont montré aussi que des extraits organiques de gingembre et de composés trouvés dans le gingembre sont très efficaces pour inhibe l'inflammation induite par la carraghénine.

IV.3. Activité antioxydante

IV.3.1. Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'HE extraite à partir des rhizomes frais de *Z. officinale* sont montrés par la figure 08 :

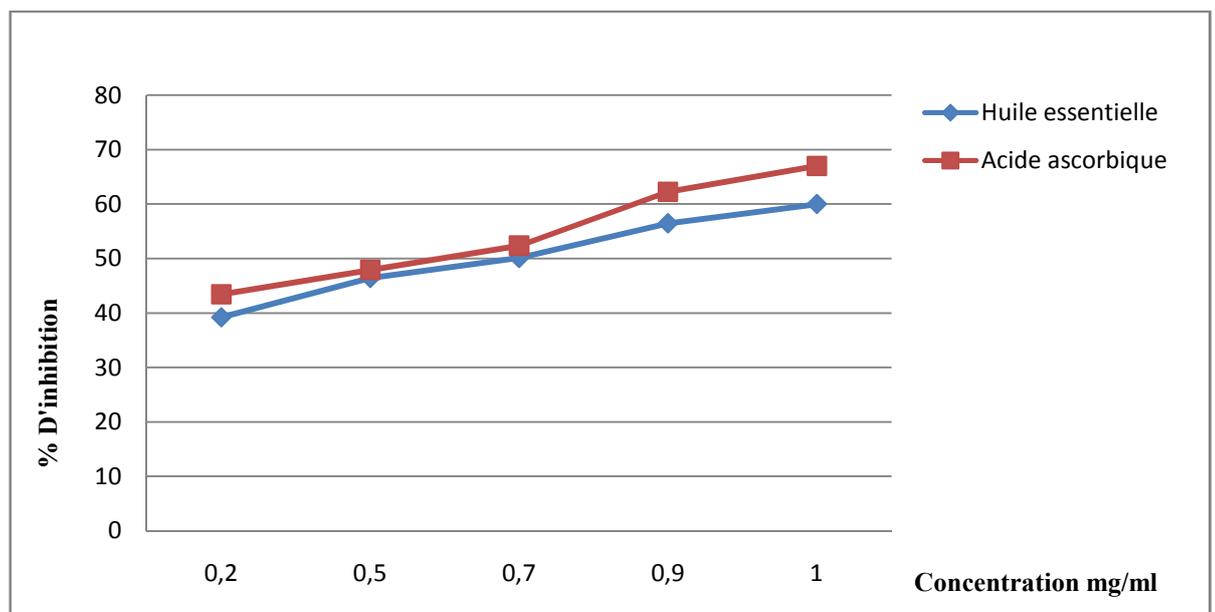


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'HE des rhizomes de *Z. officinale* et par l'acide ascorbique.

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (activité antioxydante) augmente avec l'augmentation de la concentration, aussi bien pour l'acide ascorbique que pour l'HE. Néanmoins le pourcentage d'inhibition pour l'HE reste légèrement inférieur à celui de l'acide ascorbique quelque soit la concentration.

IV.3.2. Détermination de la IC₅₀

La concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC₅₀) est inversement liée 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 valeur de IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Le tableau suivant regroupe les valeurs de IC₅₀ des échantillons testés.

Tableau 07 : Valeurs de la concentration effective qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical DPPH (IC₅₀) de l'HE et de l'acide ascorbique.

Echantillon	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.6
HE	0.7

L'HE des rhizomes frais de gingembre pouvaient ramener le radical libre stable DPPH au DPPH.H avec une IC₅₀ de 0.7 mg/ml. Il semble que l'HE de *Zingiber officinale* présente une forte activité antioxydante mais qui reste légèrement inférieure à celle de l'antioxydant de référence qui est l'acide ascorbique avec une IC₅₀ de 0.6 mg/ml.

GOVINDARAJAN (1982) a trouvé que l'HE de gingembre présente une activité antioxydante presque comparable à celle de l'antioxydant de synthèse (l'acide ascorbique).

GHASEMZADEH et al. (2010) ont montré que l'huile essentielle extraite à partir des rhizomes frais de gingembre a une bonne capacité de piégeage des radicaux libres DPPH, avec le pourcentage d'inhibition était également (51-58%), qui peuvent être utilisés comme un inhibiteur ou piègeur de radicaux libres, agissant éventuellement comme un antioxydant primaire, donc les résultats de leurs étude indiquent que *Zingiber officinale* a une forte activité antioxydante. Et **SHIRIN et PRAKASH (2010)** ont prouvé qu'une protection contre l'oxydation est assurée en présence de l'HE de *Z. officinale* qui ont montré la plus forte élimination des radicaux libres DPPH à 80%, donc ils ont conclu que le gingembre est une bonne source d'antioxydant.

Notre travail a été mené dans le cadre de la valorisation du Gingembre (*Zingiber officinale* L.)

L'extraction de l'huile essentielle des rhizomes frais de *Zingiber officinale* par hydrodistillation a donné un rendement de 1.42%. L'HE extraite avait des caractéristiques physicochimiques (Indice de réfraction, Indice d'acide, densité relative, Indice de saponification, Indice d'ester) qui concordent avec ceux rapportés par littérature.

La technique de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) a permis d'identifier dix composants, dont le composant majoritaire était le zingibérène suivi par e-citral, z-citral, sesquiphellandrene, ar-Curcumene, Farnésène, Camphene, Ocimene, β -bisabolène et Farnesol. De plus, la composition chimique par famille de l'HE du gingembre nous a révélé que cette HE est caractérisé par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (ocimène et comphène) et par les sesquiterpènes hydrocarboné (sesquiphellandrene, curcumène et zingibérène).

L'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé que l'HE de *Z. officinale* ne présente aucune activité inhibitrice sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, la présence de l'HE inhibe le développement des souches *Echerichia coli*, , *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cereviceae*, et *Aspergillus niger*. Nous avons montré que même la fraction volatile de l'HE (contacte indirecte) présente un effet inhibiteur sur la croissance microbienne notamment la souche *Bacillus subtilis* (ZI= 55mm).

L'HE du gingembre a présenté une faible activité anti-inflammatoire comparée à celle donnée par le médicament de référence (Dichlofénac). Par contre, l'activité antioxydante été très importante, comparable à celle donnée par l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique).

Les résultats de ce travail, ouvrent des perspectives intéressantes, qui peuvent être envisagées notamment concernant la caractérisation de l'HE des rhizomes de gingembre et l'identification des molécules responsables de l'activité antimicrobienne et antioxydante qui se sont révélées importantes. Il serait aussi intéressant d'évaluer les activités biologiques d'autres types d'extraits tels que les polyphénols et les tanins pour une éventuelle application dans les domaines de l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

ANNEXE 01

Techniques d'extraction des huiles essentielles

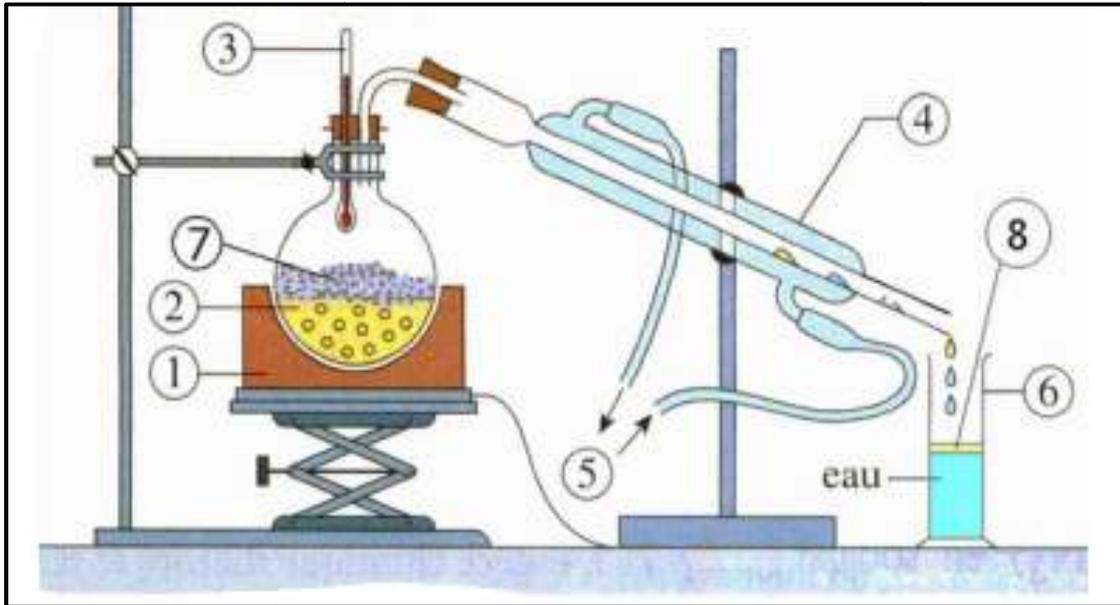


Figure 12: Schéma d'hydrodistillation (LUCCHESI *et al.*, 2007).

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| 1) Chauffe ballon. | 5) Entré et sorti d'eau. |
| 2) Ballon. | 6) Erlenmeyer. |
| 3) Thermomètre. | 7) Matière à extraire l'essence. |
| 4) Réfrigérant. | 8) La couche d'HE. |

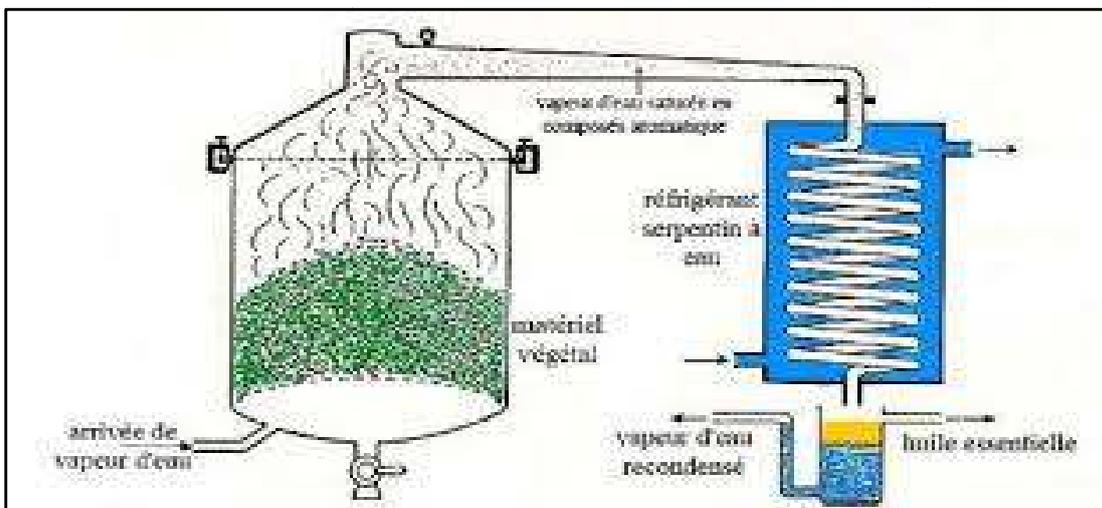


Figure 13 : Schéma d'entraînement à la vapeur d'eau (LUCCHESI *et al.*, 2007)

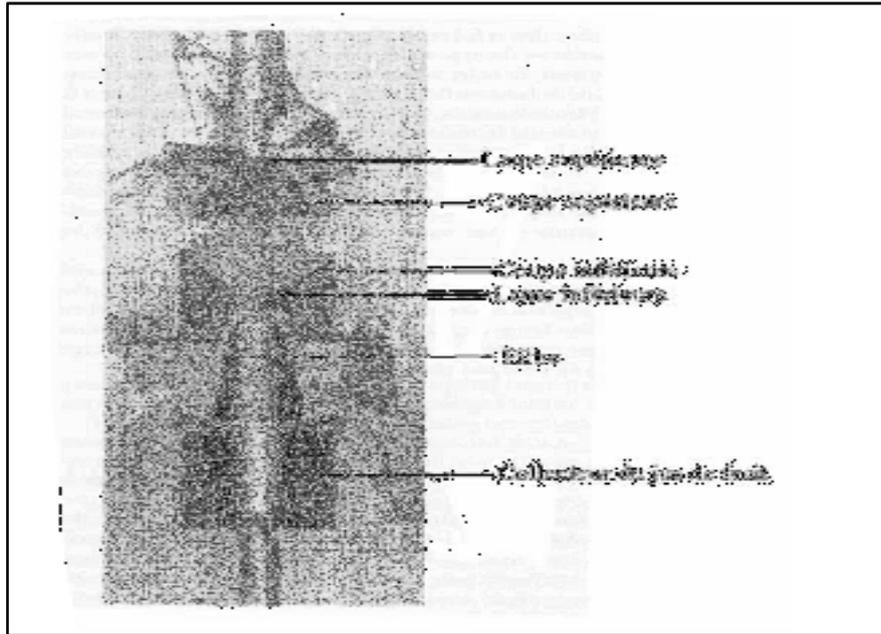


Figure 14 : Schéma d'expression à froid (LUCCHESI *et al.*, 2007).

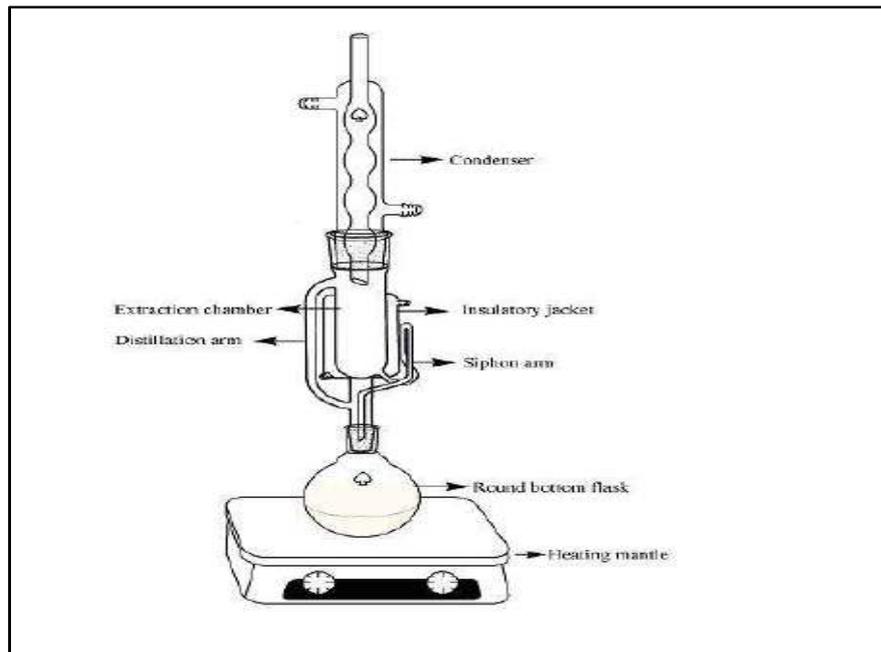


Figure 15 : Schéma d'extraction par solvants volatils (LUCCHESI *et al.*, 2007)

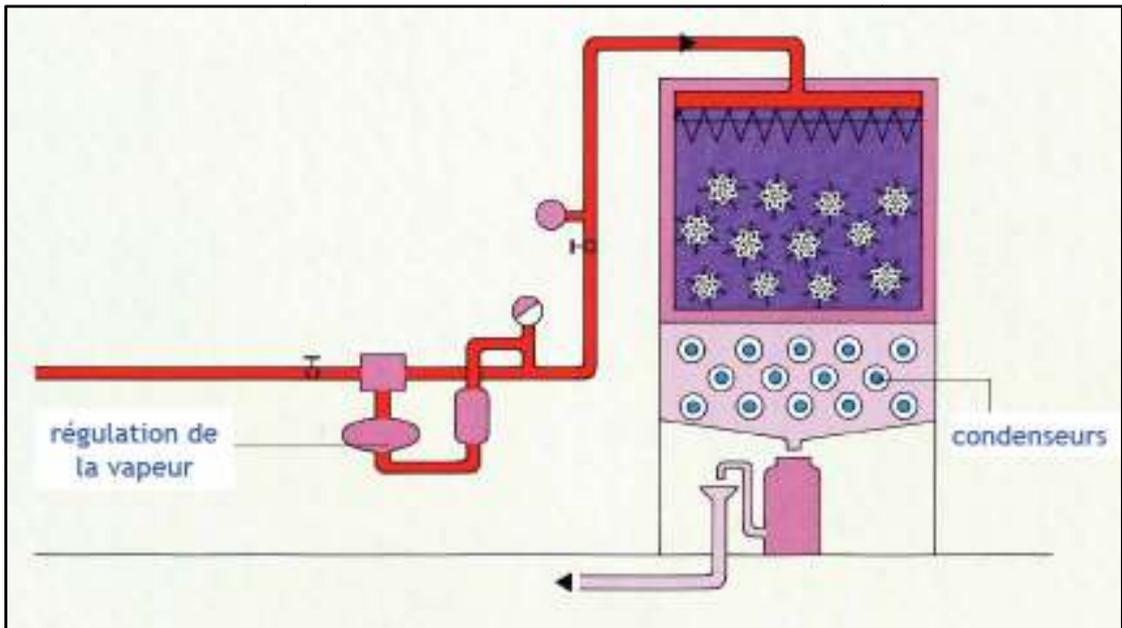


Figure 16 : Schéma d'hydrodiffusion (LUCCHESI *et al.*, 2007).

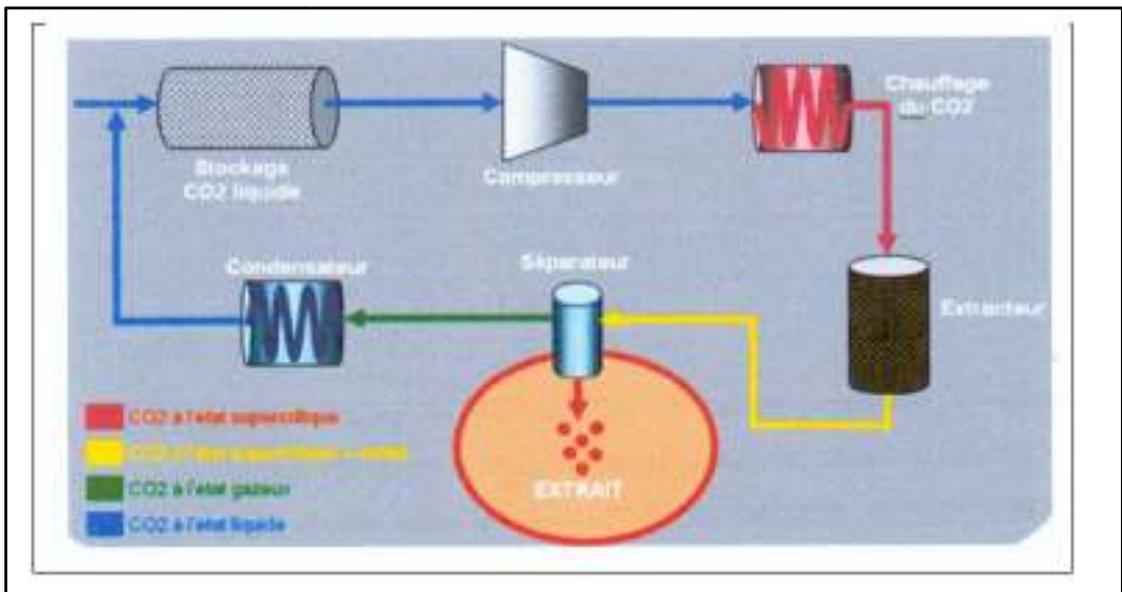


Figure 17 : Schéma d'extraction par le CO₂ supercritique (POURMORTAZAVI, 2007).



Figure 18: Extraction par micro-ondes (LUCCHESI et *al.*, 2007).



Figure 19 : Dispositif de type Clevenger.

ANNEXE 02

Chromatographie en phase gazeuse

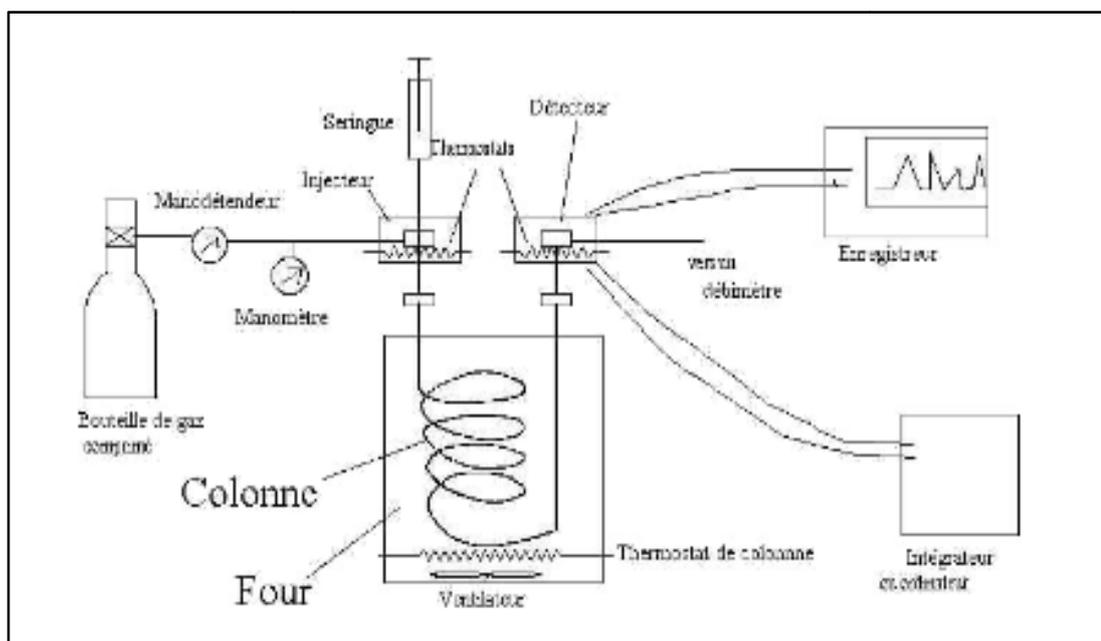


Figure 20 : Schéma de principe de la chromatographie en phase gazeuse (Besombes, 2008).

ANNEXE 03

Tableau 07: Pourcentage d'inhibition Par DPPH de l'huile essentielle et de Vitamine C.

Concentration mg/ml	0,2	0,5	0,7	0,9	1
% d'Inhibition de l'HE	39,21	46,44	50,11	56,45	59,99
% d'Inhibition de Vitamine C	43.43	47.90	52.36	62.24	66.98

Tableau 08 : poids des pattes gauches et droites des lots de souris (Témoin, référence, HE et hydrolat).

Lots	Témoin		Référence		Huile essentielle		Hydrolat	
	droite	gauche	droite	gauche	droite	gauche	droite	gauche
1	0.122	0.195	0.114	0.128	0.1066	0.1415	0.105	0.137
2	0.134	0.172	0.108	0.117	0.1226	0.1627	0.127	0.161
3	0.121	0.190	0.077	0.110	0.1169	0.1549	0.136	0.113
4	0.111	0.164	0.109	0.105	0.1188	0.1576	0.112	0.172
5	0.125	0.157	0.089	0.110	0.1135	0.1505	0.120	0.189
6	0.114	0.152	0.078	0.108	0.1165	0.1516	0.085	0.149
moyenne	0.121	0.171	0.095	0.113	0.1158	0,1531	0.113	0.153

Tableau 09 : pourcentage de l'œdème et de réduction de l'œdème des lots de souris souris (Témoin, référence, HE et hydrolat).

Lots	Témoin (eau)	Référence D.chlofénac	Huile essentielle	Hydrolat
% de l'œdème	42.32	18.94	32,39	35.39
% de réduction de l'œdème	0 %	54.16	22,04	14.35

ANNEXE 04

Provocation d'œdème.

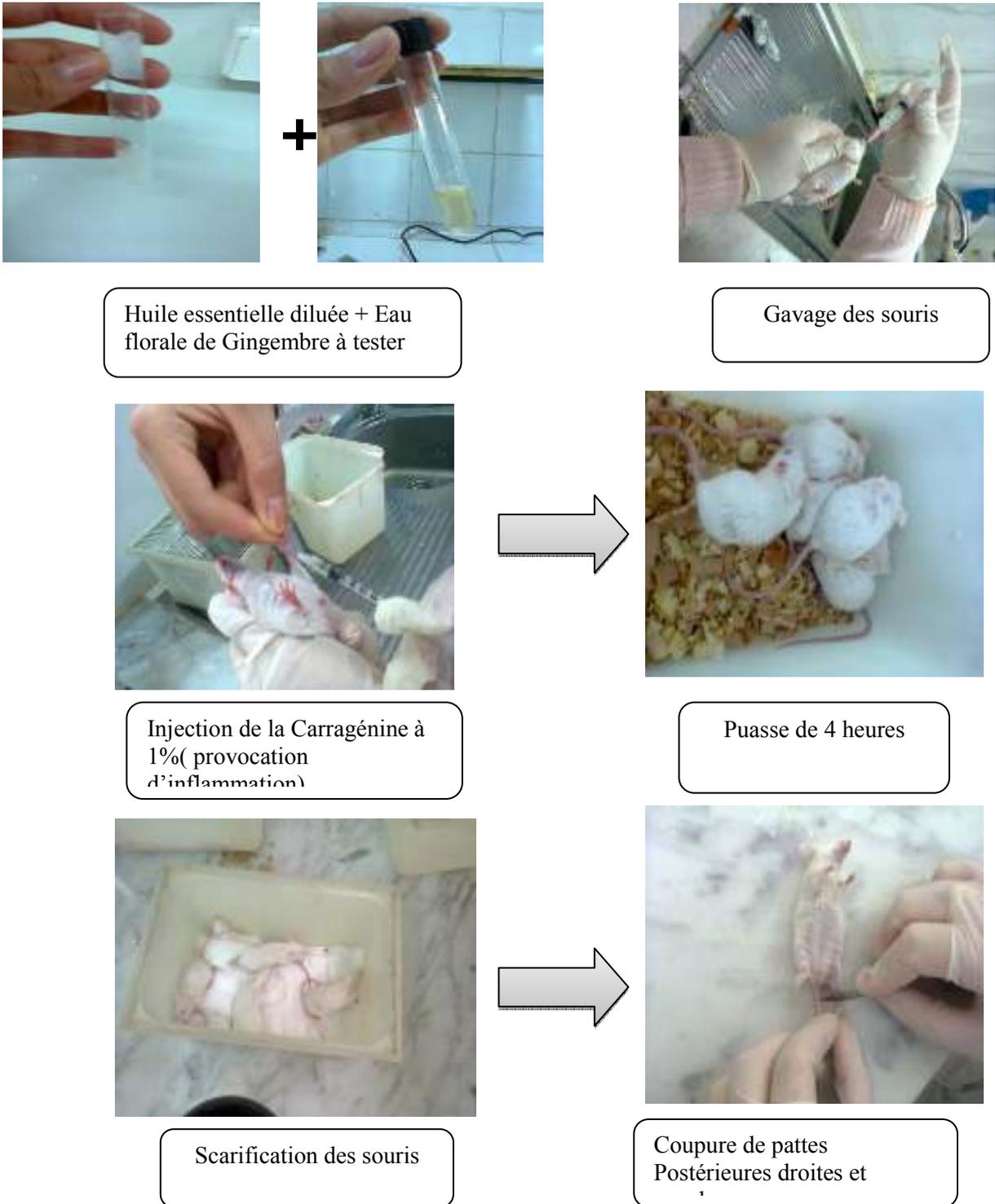


Figure 21: les étapes de provocation d'œdème.

ANNEXE 05

Le matériel et les équipements utilisés.

Petits matériels	Apparielage	Produits	Mileux de culture
<ul style="list-style-type: none"> - Ampoule à décanter - Réfrigérant - Micropipette - Boîtes de pétri - Anse de Platine - Micropipette - Disque de papiers filtres - Tube à vide - Cages - Seringues de 1ml - Bistouri 	<ul style="list-style-type: none"> - Chauffe ballon - Réfrigérant - Chambre à UV - Bain-marie - Etuve - Râpe à cuisine - Balance analytique - Thermomètre - Plaque chauffante - Ph mètre - Bain-marie - Etuve - Bec benzène - Balance pèse animaux - Etuve 	<ul style="list-style-type: none"> - Eau distillé, HCL, Alcool isoamylique, NaOH, Sodium Sulfate anhydride, hydroxyde potassium alcoolique. - Tween 80% - Eau distillé - Carragénine - Ether 	<ul style="list-style-type: none"> - MullerHinton - Sabouraud - Eau physiologique