

N°d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université de Saida– Dr. Moulay Tahar

Faculté des Sciences

**Thèse**

Présentée pour obtenir le diplôme de

**Doctorat de 3<sup>ème</sup> Cycle**

**Spécialité : Biochimie & Toxicologie Expérimentale**

**Filière : Biologie**

Par :

**M<sup>me</sup> BOUDALIA Wassila (née Lansari)**

**Thème**

**Contribution à l'évaluation de l'activité préventive de la plante  
médicinale *Petroselinum crispum* contre la toxicité du cuivre chez  
le rat wistar. Etudes immuno-hématologique et histologique.**



Thèse soutenue le 02 / 07 / 2020 devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	Lasri Boumediene	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	Berroukche Abdelkrim	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	Kharoubi Omar	Prof	Université d'Oran	Examineur
04	Krouf Djamil	Prof	Université d'Oran	Examineur
05	Terras Mohamed	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur
06	Boufadi Yasmina- Mokhtaria	MCA	Université de Mostaganem	Examineur

Année universitaire : 2019 – 2020

## *Dédicaces*

*À mon fils Wail,  
À Ma famille  
À mon mari Maamar,  
Pour avoir vécu avec moi,  
Les bons et les durs moments de la thèse,  
Qui est devenue aussi son rêve...*

## **Avant-propos**

*Ce travail s'inscrit dans un axe pluridisciplinaire, qui concerne la valorisation de la flore locale en plantes médicinales. Nous nous sommes intéressés, plus particulièrement aux plantes aromatiques qui pourraient être utilisées dans la phytothérapie contre les intoxications induites par des polluants métalliques. Et dans notre cas, l'intérêt s'est porté sur les propriétés pharmacologiques du persil (ou *Petroselinum crispum*) contre les effets toxiques du cuivre induits chez un modèle animal d'expérimentation.*

*Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse, ont été réalisés dans le laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacologie et valorisation des plantes à l'Université Moulay Tahar de Saida, avec la collaboration du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico –Chimiques de l'Université de Tlemcen, le Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé de l' Université de Mostaganem et le Laboratoire d'Anatomie et de Pathologie à l'Hôpital de Sidi bel Abbas.*

*En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Mr. **BERROUKECHE Abdelkrim**, Professeur à l'université de Saida, mon directeur de thèse, pour sa disponibilité, sa confiance, sa compréhension, sa gentillesse et son soutien tout au long de ces cinq ans de recherche. Ainsi je vous remercie infiniment pour l'honneur que vous m'avez fait d'avoir accepté d'encadrer ce travail.*

*Je tiens également à remercier Mr. **LASRI Boumediene** Professeur à l'Université de Saida, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de jury. Soyez assuré de mon profond respect et de toute mon estime.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr. **KHAROUBI Omar** Professeur à l'Université d'Oran, d'avoir bien voulu examiner cette thèse et de faire partie de mon jury. Soyez assuré de mes sincères impressions de gratitude et de respect.*

*Il m'est aussi agréable de remercier Mr. **KROUF Djamil** Professeur à l'Université d'Oran, pour juger ce travail .Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.*

*Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Dr. **TERRAS Mohamed** Maitre de Conférences classe « A » à l'Université de Saida, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant d'examiner cette thèse et de faire partie de mon jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Je voudrais sincèrement remercier Dr. **BOUFADI Mokhtaria Yasmina**, Maitre de Conférences classe « A » à l'université de Mostaganem, de me faire l'honneur de participer à ce jury et d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner cette thèse. Pour sa collaboration efficace à ce modeste travail et ses explications pertinentes et disponibilité. Soyez assuré de ma profonde gratitude pour tout ce que vous m'avez appris.*

*Je remercie sincèrement Mme. **AMARA Sabrina** pour son énorme contribution dans la réalisation de cette thèse. Qui m'a orienté, conseillé et dirigé mes premiers pas, et m'a toujours aidé chaque fois que je désirais avancer dans la recherche de différentes solutions. Je vous fais part de toute ma gratitude pour vos conseils, vos connaissances et votre expérience qui m'ont aidée dans de très nombreuses circonstances.*

*Un énorme merci à toute l'équipe de notre laboratoire de biochimie et l'équipe de Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico –Chimiques à Tlemcen.*

*Un grands remerciement à Dr. **CHAA Sara** de l'université de Mostaganem, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses connaissances. Votre aide dans ce travail mais aussi dans ma formation a été essentielle.*

*Je remercie ainsi toute l'équipe de Laboratoire d'Anatomie et de Pathologie à Sidi bel Abbes, pour m'avoir aidé à réaliser l'étude histologique de nos échantillons. Et en particulier le médecin chef Pr. **TOU Abdenacer** d'avoir accepté m'accueillir au sein du laboratoire. Merci pour votre support et surtout pour votre énorme disponibilité.*

*Enfin, Je remercie, toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*M<sup>me</sup> BOUDALIA Wassila (née Lansari)*

## Résumé

Le cuivre (Cu), un métal de transition essentiel et oligoélément, agit comme un cofacteur dans les réactions catalysées par des enzymes. Mais en excès, il peut être toxique pour les systèmes biologiques. La plante médicinale *Petroselinum crispum*, ou persil, a un impact positif sur la santé humaine grâce à sa richesse en métabolites secondaires bioactifs (flavonoïdes, polyphénols, terpènes, alcaloïdes ...). Cette étude tend à évaluer les effets préventifs de l'huile (HE.P) et l'extrait hydro-éthanolique (EEP) du persil sur les perturbations immuno-hématologique, biochimique et histologique induites par le sulfate de cuivre chez le rat Wistar.

Une étude *in vivo* a été menée, pendant 8 semaines, sur 42 rats mâles répartis en 6 groupes. Les animaux ont été exposés, pendant 60 jours, par voie orale à une concentration de 2000 ppm de sulfate de cuivre penta-hydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et en même temps traités, dans les mêmes conditions, avec une dose de 0.42 ml/Kg HE.P ou 2 g /Kg d'extrait de *Petroselinum crispum*.

HE.P présentait un rendement de 5.96 %, des propriétés organoleptiques et physico-chimiques conformes aux normes de commercialisation des huiles essentielles établies par les différentes pharmacopées.

La composition de HE.P, déterminée par CPG/SM ou CCM, montrait la présence de nombreux composés tel que pinènes , furano-coumarines , dillapiol , apiol , allyl-tétraméthoxybenzène , $\beta$ -Phellandrène , bis(2-éthylhexyl) phtalate , myristicine , trans- $\beta$ -ocimène ,  $\beta$ -myrcène,  $\gamma$ -terpinène. L'analyse du EEP par LC/SM a identifié les métabolites secondaires tels que génistéine , kaempférol ,quercétine , apigénine 4' diméthyle -éther , acide caféique, tyrosol , acide hexadécanoïque. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'extrait hydro-éthanolique révélait des teneurs élevées en ces composés par rapport à l'huile essentielle.

L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante des HE.P et EEP a été réalisée par le piégeage du radical libre DPPH• et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). La meilleure activité par rapport à l'antioxydant standard (acide ascorbique), était obtenue par l'huile essentielle suivie par l'extrait hydro-éthanolique.

Huile essentielle et l'extrait hydro-éthanolique de *Petroselinum crispum* ont été soumis à un criblage pour évaluer l'activité antimicrobienne. HE.P a révélé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* comparativement à EEP .

Par contre, Ils se sont révélés inactifs vis-à-vis *citrobacterfrendii* , *enterobactercloacae* et *Staphylococcus aureus*. Une huile essentielle, source de mono-terpènes, présentait des activités antibactériennes potentielles.

L'administration de cuivre aux rats, a induit un dysfonctionnement hépatique, rénal, cérébral et splénique se traduisant par une augmentation du taux sérique des marqueurs biochimiques (glycémie, ASAT, ALAT, créatinine, LDL, triglycérides et bilirubine) et une diminution du taux de l'urée, cholestérol total et HDL. Une diminution de marqueurs hématologiques a été constatée (hématies, lymphocytes, hémoglobine, hématocrite, plaquettes, TGMH et CCMH). L'exposition au Cu a induit des nécroses au niveau des tissus hépatique, rénal, cérébral et splénique.

Administration de 0.42 ml / Kg de HE.P ou 2 g / Kg de EEP a induit une nette amélioration du statut physiologique des animaux et la correction des altérations immuno-hématologique, biochimique et histologique.

Ces résultats montraient *in vivo* d'une part que *Petroselinum crispum*, importante source de principes actifs, était dotée d'un pouvoir préventif contre les perturbations induites par la toxicité du cuivre et d'une autre part le persil était considéré comme un chélateur spécifique pouvant substituer les médicaments.

**Mots clés** : Cuivre ; *Petroselinum crispum* ; Toxicité ; Huiles essentielles ; Extrait hydro-éthanolique ; Chélateur.

## Abstract

Copper (Cu), transition metal and trace element acts as a cofactor in reactions catalyzed by enzymes. In higher dose, it can be toxic to biological systems. Medicinal plant, *Petroselinum crispum* or parsley, has a positive impact on human health due to its richness in bioactive secondary metabolites (such as flavonoids, polyphenols, terpenes, alkaloids). This study aims to assess the preventive effects of oil (PEO) and parsley hydro-ethanolic extract (PHEE) on the immuno-hematological, biochemical and histological disturbances induced by Cu in rat.

*In vivo* study was carried out for 8 weeks on 42 male rats divided into 6 groups. Animals were exposed, for 60 days, orally to a concentration of 2000 ppm of (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O) and treated, in the same conditions, with a dose of 0.42 ml / kg PEO or 2 g / Kg of PHEE. PEO showed a yield of 5.96 %, organoleptic and physicochemical properties in accordance with the marketing standards for essential oils established by the various pharmacopoeias. PEO composition, determined by CPG / SM or CCM, revealed compounds such as pinenes, furano – coumarins, dillapiol, apiol, allyl-tetramethoxybenzene, β-Phellandrene, bis (2-ethylhexyl) phthalate, myristicine, trans-β-ocimene, β-myrcene, γ-terpinene. EEP LC / SM analysis identified secondary metabolites such as genistein, kaempferol, quercetin, apigenin 4 'dimethyl – ether, caffeic acid, tyrosol, hexadecanoic acid. PHEE determination of polyphenols and flavonoids showed high levels of compounds compared to PEO.

*In vitro* evaluation of PEO and PHEE antioxidant activities were carried out by trapping the free radical DPPH • and the reducing power of ferric ions (FRAP). The best activity compared to the standard antioxidant (ascorbic acid), was obtained by the essential oil followed by the hydro-ethanolic extract.

PEO and PHEE were screened to assess antimicrobial activity. PEO revealed a strong antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* compared to PHEE. They were inactive on *Citrobacterfrendii*, *Enterobactercloacae* and *Staphylococcus aureus*. An essential oil, a source of mono-terpenes, exhibited potential antibacterial activities.

Cu administration induced hepatic, renal, cerebral and splenic dysfunction resulting in an increase in the serum level of biochemical markers (glycemia, ASAT, ALAT, creatinine, LDL, triglycerides and bilirubin) and a decrease in the rate urea, total cholesterol and HDL. Reduction in hematological markers was observed (red blood cells, lymphocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets). Cu exposure induced necrosis at liver, kidney, brain and splenic tissue.

PEO Administration (0.42 ml / Kg) or PHEE (2 g / Kg) led to a marked improvement of animals' physiological status and recovering of biochemical and histological parameters.

These results showed *in vivo* that *Petroselinum crispum*, an important source of bioactive molecules, was endowed with a preventive power against the disturbances induced by the toxicity of copper and also parsley was considered as a specific chelator able of substitute drugs.

**Keywords:** Copper; *Petroselinum crispum*; Toxicity; Essential oils ; Hydro-ethanolic extract; Chelator.

## ملخص

يعمل النحاس، وهو معدن انتقالي أساسي، كعامل مساعد في التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات. ولكن بكميات كبيرة، فهو سام للأنظمة البيولوجية. البقدونس نبات طبي له تأثير إيجابي على صحة الإنسان بفضل ثرائه بالفيتامينات والمركبات النشطة بيولوجيا. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الآثار الوقائية للزيت والمستخلص الكحولي للبقدونس على الاضطرابات المناعية و الدموية، الكيمياء الحيوية والنسيجية الناجمة عن التأثيرات السمية لكبريتات النحاس عند ذكور الجرذان.

وقد أجريت هذه الدراسة لمدة 8 أسابيع على 42 من ذكور الجرذان مقسمة إلى 6 مجموعات. جرعت الفئران لمدة 60 يوماً بكبريتات النحاس بتركيز 2000 جزء في المليون، وفي الوقت نفسه عولجت بجرعة يومية قدرها 0.42 مل / كغ من الزيت العطري أو 2 جم / كغ من المستخلص الكحولي للبقدونس لإصلاح التلف الكبدي، الكلوي، الدماغي و الطحالي.

إن الزيت الأساسي الذي تم الحصول عليه عن طريق التقطير المائي بنسبة 5.96 % ، له الخصائص العضوية والفيزيوكيميائية وفقاً لمعايير تسويق الزيوت الأساسية التي وضعتها مختلف دساتير الأدوية.

يُظهر تحديد زيت البقدونس بواسطة المقياس الطيفي بالكتلة أو التشبع الغازي و الامتزاز الاستشرابي الغشائي وجود العديد من المركبات مثل البنين والفورانوكومارين و الديلابيول و الأبيول و الأليل تيتراأموكسي بنزين و بيتا فيلندين و الثنائي إيثيل ايكزيل فتالات و الميرستين و الأوسيمان المتحول، البيتاميرسان، الغاما تريبين، إلخ. وبالمثل، فإن التحليل بواسطة الفصل اللوني السائل للمستخلص المائي و الايثلي جعل من الممكن تحديد العديد من النواتج الأيضية الثانوية مثل الجينيسيتين، الكيمبفيرول، الكيرسيتين، أيجنين ثنائي ميثيل الإيثير الرباعي، حمض الكافيين، حمض التيروزول، حمض النخيل، إلخ. تم التأكيد على ذلك من خلال التحليل الكمي الذي يعتمد على تحديد البوليفينولات الكلية والفلافونويدات، بحيث تم إثبات أن المستخلص المائي-الإيثانولي يحتوي على أعلى محتوى من هذه المركبات مقارنة بالزيت الأساسي. هذه النواتج الأيضية الثانوية لها مجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية وتلعب دوراً معترفاً به في الحفاظ على الصحة الجيدة.

تم إجراء تقييم مختبري لنشاط مضاد للأكسدة للزيت الأساسي والمستخلص المائي و الكحولي من خلال طريقتين، هما: محاصرة الجذور الحرة والقوة المختزلة للأيونات الحديدية. أحسن نشاط مضاد للأكسدة مقارنة مع مضادات الأكسدة الاصطناعية (حمض الأسكوربيك)، هي الزيوت الأساسية يليها المستخلص المائي الإيثانولي بالإضافة إلى ذلك، تم فحص الزيت الأساسي و المستخلص الكحولي للبقدونس بحثاً عن نشاط محتمل مضاد للميكروبات كشف زيت البقدونس عن نشاط قوي مضاد للجراثيم تجاه السالمونيلا التيفيموريوم، الإشريشيا كولي و الكلبسيلا الرئوية مقارنة مع المستخلص المائي - الكحولي. من ناحية أخرى، أثبتت أنها غير نشطة تجاه الجرثوم الليموني والمعوي والمكورات العنقودية الذهبية. لقد ظهر اتجاه يشير إلى أن الزيت العطري الغني جداً بالتربين الأحادي يحتوي على أعلى أنشطة مضادة للجراثيم.

إعطاء النحاس للجرذان، أدى الى اختلال وظيفي كبدي ، كلوي ، دماغي و طحالي سبب في زيادة للعلامات البيوكيميائية في المصل (سكر الدموي ، الألبانين و الأسبرتيزيرانيميناييز، الكرياتينين ، البروتين الدهني المنخفض الكثافة ، الدهون الثلاثية الكلي ، البيليروبين الكلي ، المباشر ، وغير المباشر ) وانخفاض في مستوى اليوريا والكوليسترول الكلي والبروتين الدهني العالي كثافة . وكذلك، لوحظ انخفاض في المؤشرات الحيوية الدموية (خلايا الدم الحمراء، خلايا الدم البيضاء) (الخلايا اللمفاوية وحييدات الخلية) ، الهيموغلوبين ، الهيماتوكريت ، الصفائح الدموية ، المحتوى الكروي المتوسط للهيموغلوبين والتركيز الخلوي المتوسط للهيموغلوبين). لقد ثبت أنه يسبب نخرًا وتلف في الكبد والكلى والدماغ والطحال. ومع ذلك، أدى العلاج ب 0.42 مل / كغ من الزيت الأساسي أو 2 جم / كغ من المستخلص المائي و الكحولي للبقدونس إلى تحسن ملحوظ في مختلف الاضطرابات المناعية والكيمياء الحيوية والنسجية.

تبين من هذه النتائج أن البقدونس الغني بالمكونات النشطة، يتمتع بقدرة وقائية أو تصحيحية للتلف الناجم عن الآثار السامة للنحاس عند الجرذان ويمكن اعتباره علاجًا مخلي انتقائي يمكن أن يحل محل الأدوية وبالتالي يقلل من تأثير أعراضها الجانبية.

كلمات مفتاحية: النحاس , البقدونس , سمية, زيوت أساسية , مستخلص المائي و الايثانولي , مخلي انتقائي.

## Liste des abréviations

- ADN** : acide désoxyribonucléique.
- ALAT**: alanine aminotransférase.
- AlCl<sub>3</sub>** : trichlorure d'aluminium.
- ASAT**: aspartate aminotransférase.
- Bil T** : bilirubine totale.
- Cd** : cadmium.
- CDDP**: cis-diaminedichloroplatine(II).
- CCL<sub>4</sub>** : tétrachlorure de carbone.
- Cu** : cuivre.
- CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O** : cuivre penta-hydraté.
- CPG/SM** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- CCM** : chromatographie sur couche mince.
- CCMH** : concentration corpusculaire moyen en hémoglobine.
- CHCL<sub>3</sub>** : chloroforme.
- CH<sub>3</sub>OH** : méthanol.
- C-VLDL** : cholestérol-lipoprotéine de très basse densité.
- Déc** : décoction.
- DPPH** : 1,1 - diphényl - 2 – picrylhydrazyle.
- EEP** : extrait hydro-éthanolique.
- FeCL<sub>3</sub>** : chlorure ferrique.
- FRAP** : pouvoir réducteur des ions ferriques.
- GSH-Px** : glutathion peroxidase.
- HCL** : chlorure d'hydrogène.
- HD** : hydro-distillation.
- HDL** : lipoprotéines de haute densité.
- HE.P** : huile essentielle de *petroselinum crispum*.
- HE.S** : huiles essentielles.
- HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute performance.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : acide sulfurique.

**IDR** : indice de distribution corpusculaire

**IE** : impact électronique.

**IIL**: infiltrats inflammatoire lymphocytaire.

**Inf** : infusion.

**K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>** : ferricyanure de potassium.

**LB** : lysogeny broth.

**LC/SM** : chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse.

**LDL** : lipoprotéines de basse densité.

**M** : molarité.

**Mac** : macération.

**M.S** : matière sèche.

**µl** : microlitre.

**µm** : micromètre.

**µg** : microgramme.

**N** : normalité.

**NADPH** : nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate.

**NAFLD**: maladie du « foie gras » non-alcoolique.

**NO**: oxyde nitrique.

**NaOH** : hydroxyde de sodium.

**NH<sub>4</sub>OH** : ammoniacque.

**ppm** : partie par million.

**p/v** : poids / volume.

**RDT** : rendement.

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène.

**TGO**: Transaminase Glutamate Oxaloacetate.

**TGP**: Transaminase Glutamate Pyruvate.

**TGMH** : teneur globulaire moyen en hémoglobine.

**TR** : tubules rénaux.

**VC** : veine Centro-lobulaire.

**VSD** : vaisseau sanguine dilaté.

## **Liste des tableaux et figures**

### **Liste des tableaux**

#### **Partie bibliographique**

<b>Tab.1</b>	Classification de <i>Petroselinum crispum</i> (Chauhan et Aishwarya ,2018).	<b>19</b>
<b>Tab .2</b>	Utilisations ethnométricinales du <i>Petroselinum crispum</i> .	<b>20</b>
<b>Tab.3</b>	Composition de l'extrait alcoolique (éthanol) des feuilles de <i>Petroselinum crispum</i> (Al-Haadi et al., 2013).	<b>21</b>
<b>Tab.4</b>	Composition phyto-chimique des polyphénols de persil par HPLC (Hozayen et al., 2016 ;Marwa , 2019).	<b>22</b>
<b>Tab.5</b>	Dosage des polyphénols et flavonoïdes (Marwa , 2019).	<b>22</b>
<b>Tab.6</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de persil par CPG/SM (Gilles, 2014).	<b>23</b>
<b>Tab.7</b>	Composition chimique d'autres substances bioactives identifiées dans le persil (Farzaei et al ., 2013 ; Hozayen et al ., 2016 ; Dobričević et al., 2019).	<b>24</b>
<b>Tab.8</b>	Composition nutritionnelle et apport calorique en moyenne pour 100 g de persil (Anses, 2017).	<b>25</b>
<b>Tab.9</b>	Récapitulatif des propriétés thérapeutiques de persil ( <i>Petroselinum crispum</i> ) (Mahmood et al ., 2014 ; Craft et Setzer , 2017 ; Hozayen et al ., 2016 ; Chandler , 2008 ;Linde , 2016 ; Pineda , 2018 ; Nirumand et al ., 2018 ; Dobričević et al ., 2019 ; Farzaei et al ., 2013) .	<b>31</b>

#### **Partie expérimentale**

<b>Tab.10</b>	Conditions opératoires de l'extraction des HE.s par HD .	<b>35</b>
<b>Tab.11</b>	spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phyto-chimique (Békro et al ., 2007 ; Karumi et al ., 2004 ; Badiaga, 2012 ; Oloyede ,2005 ; Majob et al ., 2003 ) .	<b>41</b>
<b>Tab.12</b>	Méthodes de détermination de l'activité anti-oxydante <i>in vitro</i> (Huang et al ., 2005 ;Karadag et al .,2009).	<b>49</b>
<b>Tab.13</b>	Description et pouvoir pathogène des souches testées.	<b>52</b>
<b>Tab.14</b>	Taux d'humidité de persil frais.	<b>62</b>

<b>Tab.15</b>	Rendements des HE.s obtenues par hydrodistillation.	<b>62</b>
<b>Tab.16</b>	Comparaison du rendement en huiles essentielles à partir des graines sèches non broyées et celui obtenue à partir des graines sèches broyées.	<b>63</b>
<b>Tab.17</b>	Les rendements de l'HE puisées dans la littérature (Taleb-toudert ,2015).	<b>63</b>
<b>Tab.18</b>	Caractéristiques organoleptiques des essences étudiées.	<b>64</b>
<b>Tab.19</b>	Caractéristiques physiques des HE.s extraites.	<b>64</b>
<b>Tab.20</b>	Caractéristiques physiques des HE.s puisées dans dans la littérature (Didier, 2000 ;Caratini, 1983).	<b>65</b>
<b>Tab.21</b>	Propriétés chimiques des essences étudiées.	<b>65</b>
<b>Tab.22</b>	Propriétés chimiques de persil puisées dans dans la littérature (Didier, 2000 ; Lazouni et al ., 2007).	<b>66</b>
<b>Tab.23</b>	Résultats des tests phyto-cgimiques d'extraits de <i>Petroselinum crispum</i> obtenus par infusion, macération et décoction.	<b>67</b>
<b>Tab.24</b>	Le rendement, l'aspect et la couleur de l'extrait brut hydro-éthanolique.	<b>71</b>
<b>Tab.25</b>	Etude des arlypropènes extraits de l'huile essentielle de persil <i>Petroselinum crispum</i> (Mill)] (Lamarati et al ., 1993).	<b>75</b>
<b>Tab.26</b>	Résultats de la chromatographie sur couche mince des huiles essentielles : Huile de feuilles de persil obtenue (A), HE de feuille de persil achetée (B), huile de graines de persil obtenue (C), HE de graines de persil acheté (D) et de fenouille (E).	<b>76</b>
<b>Tab.27</b>	Analyse par CPG –SM de l'HE de persil.	<b>79</b>
<b>Tab.28</b>	Pourcentages des constituants des HE.s étrangères du persil (Tadros et al., 2017 ; Linde et al ., 2016 ; Craft et Setzer , 2017 ; Ouis , 2015).	<b>82</b>
<b>Tab.29</b>	Composition chimique d'extrait de feuilles de <i>Petroselinum crispum</i> par LC-SM.	<b>85</b>
<b>Tab.30</b>	Valeurs des CI <sub>50</sub> d'EEP et HE.P	<b>88</b>
<b>Tab.31</b>	Diamètres des zones d'inhibitions de l'extrait et l'huile essentielle de <i>Petroselinum crispum</i> relatives aux différentes souches selon la méthode des disques.	<b>93</b>
<b>Tab.32</b>	Signes pathologiques et comportementaux des rats au cours de l'expérimentation. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile	<b>96</b>

essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP

- Tab.33** Variation des paramètres hématologiques, chez les rats traités ou/non par (EEP) ; (HE.P) et de sulfate penta-hydraté de cuivre après 60 jours . 99  
\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P <0.001, pour  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (G2) ; huile essentielle (G3) ; extrait de persil (G5) vs témoin (G1).  
#P < 0.05, ##P <0.01, and ###P <0.001, intoxiqué groupe (G2) vs .  
P : Seuil de signification.  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.
- Tab.34** Variation des poids final relatifs au control et taux de croissance chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement. 105  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP .
- Tab.35** Variation des poids relatifs du cerveau, foie, des reins et de la rate chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement 106  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

## Listes des figures

### Partie bibliographique

- Fig. 1** Représentation schématique de la répartition globale du cuivre dans le corp . 7
- Fig. 2** Feuilles, graines et racines de *Petroselinum crispum* . 19

## **Partie expérimental**

<b>Fig. 3</b>	Persil utilisé pour l'identification.	<b>33</b>
<b>Fig. 4</b>	Carte de situation géographique de la wilaya de Saida.	<b>33</b>
	Le dispositif utilisé pour d'hydro-distillation.	<b>35</b>
<b>Fig. 5</b>		
<b>Fig. 6</b>	Méthodologie adoptée pour l'étude phytochimique et biologique des extraits bruts et les huiles essentielles de <i>Petroselinum crispum</i> .	<b>40</b>
<b>Fig. 7</b>	Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de persil EEP.	<b>43</b>
<b>Fig. 8</b>	Dispositif de GC/SM.	<b>47</b>
<b>Fig.9</b>	Réaction entre le radical DPPH et l'antioxydant pour former le DPPH .	<b>49</b>
<b>Fig. 10</b>	Préparation des dilutions successives de 1/2.	<b>54</b>
<b>Fig. 11</b>	Principe de la méthode de diffusion sur disques.	<b>55</b>
<b>Fig. 12</b>	Le sulfate de cuivre penta-hydraté.	<b>55</b>
<b>Fig. 13</b>	Protocole expérimental des rats.	<b>57</b>
<b>Fig. 14</b>	Rats wistar dans les cages avant le sacrifice.	<b>58</b>
<b>Fig. 15</b>	Observation en microscope optique des canaux sécréteurs de tige <i>petroselinum crispum</i> grossissement $\times 40$ .	<b>61</b>
<b>Fig. 16</b>	Observation en microscope optique de feuille de <i>P. crispum</i> grossissement $\times 40$ .	<b>70</b>
<b>Fig. 17</b>	Observation en microscope optique de tige de <i>P. crispum</i> grossissement $\times 40$ .	<b>70</b>
<b>Fig. 18</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	<b>72</b>
<b>Fig.19</b>	Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait EEP et l'huile essentielle étudiés.	<b>72</b>
<b>Fig. 20</b>	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.	<b>73</b>
<b>Fig. 21</b>	CCM analytique représentative des différentes huiles essentielles utilisées sur plaque de gel de silice développée dans le système solvant un mélange chloroforme : benzène (75:25, v/v).	<b>74</b>
<b>Fig. 22</b>	Chromatogramme en impact électronique des différentes huiles essentielles 1. Chromatogramme en impact électronique de l'HE de fenouille . 2. Chromatogramme en impact électronique de l'HE de feuilles de persil achetée à la pharmacie. 3. Chromatogramme en impact électronique de HE de graines de persil obtenu.	<b>77</b>
<b>Fig. 23</b>	Spectre de masse en (IE) du composé majoritaire ( $\beta$ -Pinène) de l'HE de persil.	<b>78</b>

<b>Fig. 24</b>	Chromatogramme en impact électronique de l'HE de persil.	<b>81</b>
<b>Fig. 25</b>	Spectre de masse en (IE) de Tr =44,204.	<b>81</b>
<b>Fig. 26</b>	Spectre de masse en (IE) de Tr =46 ,521.	<b>82</b>
<b>Fig. 27</b>	Analyse quantitative de l'extrait de feuilles de <i>Petroselinum crispum</i> utilisé en chromatographie LC/SM.	<b>85</b>
<b>Fig. 28</b>	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'HE de <i>Petroselinum crispum</i> .	<b>86</b>
<b>Fig. 29</b>	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait de <i>Petroselinum crispum</i> .	<b>87</b>
<b>Fig. 30</b>	Valeurs de CI <sub>50</sub> pour l'extrait hydro-éthanolique et l'huile essentielle de <i>Petroselinum crispum</i> .	<b>89</b>
<b>Fig. 31</b>	Réduction de fer de l'HE.P et de l'acide ascorbique.	<b>90</b>
<b>Fig. 32</b>	Réduction de fer de l'extrait et de l'acide ascorbique.	<b>90</b>
<b>Fig. 33</b>	Réduction de fer de l'extrait, HE.P et de l'acide ascorbique.	<b>91</b>
<b>Fig. 34</b>	Effet de l'extrait de persil sur la croissance de : A : <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311) ;B : <i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090) ; C : <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) ; D : <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 70603) ;E : <i>Enterobactercloacae</i> (ATCC 13047) ;F : <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25933) ;G : <i>Candidas albicans</i> (ATCC 10231-IP444).	<b>95</b>
<b>Fig. 35</b>	Effet de l'huile essentielle de persil sur la croissance de : A : <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311) ;B : <i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090) ; C : <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) ; D : <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 70603) ;E : <i>Enterobactercloacae</i> (ATCC 13047) ;F : <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25933) ;G : <i>Candidas albicans</i> (ATCC 10231-IP444).	<b>96</b>
<b>Fig. 36</b>	Signes pathologiques etcomportementaux des rats aucours de l'expérimentation : A : somnolence et hypoactivité, B : hypersalivation, conjonctivite et rhinite, C : anorexie et dystonie (observation avant la dissection).	<b>97</b>
<b>Fig. 37</b>	Variation des poids chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de <i>petroselinum crispum</i> (HE.P); G4 :une mixture de CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : ne mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.	<b>104</b>

- Fig. 38** Variation des poids initiale et final chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **105**
- Fig. 39** Glycémie (g/L) chez le lot témoin et les lots traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **108**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.
- Fig. 40** Concentration sérique de l'urée (g/L) chez les rats traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **109**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.
- Fig. 41** Concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **110**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.
- Fig. 42** Les teneurs sériques de cholestérol total, HDL et LDL (g/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **111**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/ Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP.
- Fig. 43** Les teneurs sériques de triglycéride (g/l) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **112**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.
- Fig. 44** Les teneurs sériques de l'aspartate aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. **113**  
G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

- Fig. 45** Les teneurs sériques de l'alanine aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **114**
- Fig. 46** Les taux de bilirubine totale, direct et indirect (g/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP. **115**
- Fig. 47** Coupes histologiques de foie des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre ; C : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F: une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **116**
- Fig. 48** Coupes histologiques des reins des rats du groupe : A : Témoin ; B: 2000 ppm de sulfate de cuivre; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F: une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **117**
- Fig. 49** Coupes histologiques de cerveau des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre ; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F: une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **119**
- Fig. 50** Coupes histologiques de la rate des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F: une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP. **121**

## Table des matières

«Contribution à l'évaluation de l'activité préventive de la plante médicinale *Petroselinum crispum* contre la toxicité du cuivre chez le rat wistar. Etudes immuno-hématologique et histologique»

Dédicace

Avant propos

Résumé

ABSTRACT

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Table des matières

## Partie bibliographique

	<b>Page</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b><u>Chapitre I : Toxicité du Cuivre et pathologies associées</u></b>	
<b>I.1. Fonction biologique</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Cuivre : Un métal pré-védique utilisé en médecine</b>	<b>5</b>
<b>I.3. Recommandations alimentaires pour le cuivre</b>	<b>5</b>
<b>I.4. Absorption, distribution et métabolisme du cuivre</b>	<b>6</b>
<b>I.4.1. Absorption et distribution du cuivre</b>	<b>6</b>
<b>I.4.2. Métabolisme du cuivre</b>	<b>7</b>
<b>I.5. Régulation centrale et stockage du cuivre : Troubles liés à la toxicité de cuivre</b>	<b>8</b>
<b>I.6. Rôle du cuivre dans la santé humaine</b>	<b>10</b>
<b>I.6.1. Pathologies associées a un excès de cuivre</b>	<b>10</b>
<b>I.6.1.2. Maladie de Wilson (MW)</b>	<b>10</b>
<b>I.6.1.3. Troubles non wilsoniens (toxicose du cuivre)</b>	<b>11</b>
<b>I.6.1.4. Maladie d'Alzheimer</b>	<b>11</b>

<b>I.6.1.5. Maladies à prions</b>	<b>12</b>
<b>I.6.1.6. Maladie de Parkinson(MP)</b>	<b>13</b>
<b>I.6.1.7. Diabète</b>	<b>13</b>
<b>I.6.1.8. Cancer</b>	<b>14</b>
<b>I.7. Chélatothérapie</b>	<b>15</b>
<b>I.8.Utilisation des antioxydants</b>	<b>15</b>

## **Chapitre II: Persil ( *Petroselinum crispum* ) et ses propriétés thérapeutiques**

<b>II.1. Histoire du persil en phytothérapie</b>	<b>17</b>
<b>II.2. Origine et répartition géographique</b>	<b>18</b>
<b>II.3. La description botanique du persil</b>	<b>18</b>
<b>II.4. Classification et systématique</b>	<b>19</b>
<b>II.5. Les utilisations ethno -médicinales</b>	<b>19</b>
<b>II.6. Analyses phyto-chimiques</b>	<b>20</b>
<b>II.6.1. Criblage phyto-chimique</b>	<b>21</b>
<b>II.6.2. Identification chromatographique et spectroscopique</b>	<b>21</b>
<b>II.6.3. Composition nutritionnelle</b>	<b>25</b>
<b>II.7. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Petroselinum crispum</i></b>	<b>26</b>
<b>II.7.1. Propriétés physiques</b>	<b>26</b>
<b>II.7.1.1. Caractéristiques organoleptiques</b>	<b>26</b>
<b>II.7.1.2. Détermination de PH</b>	<b>27</b>
<b>II.7.1.3. Densité relative</b>	<b>27</b>
<b>II.7.1.4. Pouvoir rotatoire</b>	<b>27</b>
<b>II.7.1.5. Miscibilité à l'éthanol</b>	<b>27</b>
<b>II.7.2. Propriétés chimiques</b>	<b>27</b>
<b>II.7.2.1. Indice d'acide</b>	<b>27</b>
<b>II.7.2.2. Indice d'ester</b>	<b>27</b>
<b>II.8. Propriétés thérapeutiques de persil (<i>Petroselinum crispum</i>)</b>	<b>27</b>
<b>II.8.1. Activité anti-oxydante</b>	<b>27</b>

<b>II.8.2.</b> Activité antidiabétique et hépato-protecteur	<b>27</b>
<b>II.8.3.</b> Activité anticancéreuse	<b>28</b>
<b>II.8.4.</b> Activité immuno-modulatrice	<b>28</b>
<b>II.8.5.</b> Activité analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique	<b>28</b>
<b>II.8.6.</b> Action anti-allergique	<b>28</b>
<b>II.8.7.</b> Activité spasmolytique	<b>29</b>
<b>II.8.8.</b> Activité neuro-protecteur	<b>29</b>
<b>II.8.9.</b> Activité néphroprotecteur	<b>29</b>
<b>II.8.10.</b> Activité anti –plaquettaire et effet hypotenseur	<b>29</b>
<b>II.8.11.</b> Activité antimicrobienne et cytotoxique	<b>30</b>
<b>II.8.12.</b> Activité antifongique et antimycosique	<b>30</b>
<b>II.8.13.</b> Effet protecteur pour l'appareil digestif	<b>30</b>
<b>II.8.14.</b> Activité anti-ostéoporotique et œstrogénique	<b>30</b>
<b>II.9.</b> Les apports de <i>Petroselinum crispum</i> dans la chélatothérapie	<b>32</b>

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III: Matériels et méthodes**

<b>III.1.</b> Matériel végétal	<b>33</b>
<b>III.2.</b> Situation géographique de la région	<b>33</b>
<b>III.3.</b> Etude de la structure sécrétrice des huiles essentielles	<b>34</b>
<b>III.4.</b> Extraction par dispositif d'hydro-distillation( HD)	<b>34</b>
<b>III.5.</b> Détermination des indices physico chimiques des HE .s extraites de <i>Petroselinum crispum</i> (Ouis, 2015)	<b>37</b>
<b>III.5.1.</b> Propriétés physique	<b>37</b>
<b>III.5.1.1.</b> Détermination de PH	<b>37</b>
<b>III.5.1.2.</b> Densité relative à 20°C	<b>37</b>
<b>III.5.1.3.</b> Miscibilité à l'éthanol	<b>38</b>

III.5.1.4. Point de congélation	38
III.5.1.5. Pouvoir rotatoire	38
III.5.2. Propriétés chimiques	39
III.5.2.1. L'indice d'acide	39
III.5.2.2. Indice d'ester (Ie)	39
III.6. Analyses phyto-chimiques et biologiques	40
III.6.1. Analyses phyto-chimiques	41
III.6.1.1. Criblage phyto-chimique	41
III.6.1.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	44
III.6.1.2.1. Détermination de la teneur en poly-phénols totaux	44
III.6.1.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	45
III.6.1.3. Identification chimique de persil par chromatographie sur couche mince (CCM)	46
III.6.1.4. Identification chimique de <i>Petroselinum crispum</i> par CPG / SM-IE	46
III.6.1.5. Identification chimique de <i>Petroselinum crispum</i> par LC/SM	47
III.6.2. Evaluation in vitro des activités biologiques	48
III.6.2.1. Le potentiel antioxydant de nos extraits de <i>Petroselinum crispum</i>	48
III.6.2.2. Evaluation du potentiel antimicrobien	51
III.6.3. Evaluation in vivo des activités biologiques	55
III.6.3.1. Produit chimique (Le sulfate de cuivre penta-hydraté)	55
III.6.3.2. Répartition des groupes, prélèvements sanguins et d'organe	56
III.6.3.3. Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques	58
III.6.3.4. Etude histologique	58
Analyse statistique	60
<b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b>	
IV.1. Etude de la structure sécrétrice des huiles essentielles	61
IV.2. Extraction des huiles essentielles par la technique d'hydro-distillation	61
IV.2.1. Calcul du taux d'humidité de persil	61
IV.2.2. Calcul des rendements	62

<b>IV.2.3.</b> Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles	<b>63</b>
<b>IV.3.</b> Détermination des indices physico-chimiques des HE.s extraites	<b>63</b>
<b>IV.3.1.</b> Propriétés physiques	<b>63</b>
<b>IV.3.1.1.</b> Caractéristiques organoleptiques	<b>63</b>
<b>IV.3.2.</b> Propriétés chimiques	<b>65</b>
<b>IV.3.2.1.</b> Indice d'acide	<b>66</b>
<b>IV.3.2.2.</b> Indice d'ester	<b>66</b>
<b>IV.3.2.3.</b> Indice de saponification	<b>66</b>
<b>IV.4.</b> Analyses phyto-chimiques et biologiques	<b>66</b>
<b>IV.4.1.</b> Analyses phyto-chimiques	<b>66</b>
<b>IV.4.1.1.</b> Résultats des caractérisations phyto-chimiques	<b>66</b>
<b>IV.4.1.2.</b> Rendement en extrait sec de la plante	<b>70</b>
<b>IV.4.1.3.</b> Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	<b>71</b>
<b>IV.4.1.3.1.</b> Détermination de la teneur en poly-phénols totaux	<b>71</b>
<b>IV.4.1.3.2.</b> Détermination de la teneur en flavonoïdes	<b>73</b>
<b>IV.4.1.3.3.</b> Caractérisation phyto-chimique par chromatographie sur couche mince (CCM)	<b>73</b>
<b>IV.4.1.3.4.</b> Caractérisation phyto-chimique par chromatographique (CPG/SM)	<b>77</b>
<b>IV.4.1.3.4.1.</b> Comparaison entre la composition chimique de l'HE de persil avec des essences étrangère	<b>82</b>
<b>IV.4.1.3.5.</b> Analyse chromatographique par LC-SM	<b>84</b>
<b>IV.4.1.</b> Analyse biologiques	<b>86</b>
<b>IV.4.1.1.</b> Evaluation in vitro des activités biologiques de l'extrait brut (EEP) et l'huile essentielle de <i>Petroselinum crispum</i> (HE.P)	<b>86</b>
<b>IV.4.1.1.1.</b> Effet antioxydant de l'huile essentielle de <i>Petroselinum crispum</i> (piégeage du radical DPPH•)	<b>86</b>
<b>IV.4.1.1.2.</b> Effet antioxydant de l'extrait hydro- alcoolique de <i>Petroselinum crispum</i> (Piégeage du radical DPPH•)	<b>86</b>

<b>IV.4.1.1.3.</b> Détermination de l'index CI <sub>50</sub>	<b>88</b>
<b>IV.4.1.1.4.</b> Activité anti-oxydante de l'huile essentielle et l'extrait brut par réducteur de fer (FRAP)	<b>98</b>
<b>IV.4.1.1.5.</b> Evaluation de l'activité antimicrobienne	<b>92</b>
<b>IV.4.2.2.</b> Evaluation <i>in vivo</i> des activités biologiques de l'extrait brut (EEP) et l'huile essentielle de <i>Petroselinum crispum</i> (HE.P)	<b>96</b>
<b>IV.4.2.2.1.</b> Observation de signes comportementaux	<b>96</b>
<b>IV.4.2.2.2.</b> Influence des traitements sur les variations des paramètres hématologiques	<b>97</b>
<b>IV.4.2.2.3.</b> Influence du traitement sur les variations du poids corporel et pondérales des organes	<b>103</b>
<b>IV.4.2.2.4.</b> Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques	<b>107</b>
<b>IV.4.2.2.5.</b> Etude histologique	<b>115</b>
<b>IV.4.2.2.6.</b> Effet de cuivre, l'huile essentielle (HE.P) et l'extrait hydro-éthanolique (EEP) sur les paramètres lipidiques	<b>122</b>
<b>IV.4.2.2.7.</b> Effet de sulfate de cuivre sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotectrice de l'huile essentielle et l'extrait de <i>Petroselinum crispum</i>	<b>123</b>
<b>IV.4.2.2.8.</b> Effet de sulfate de cuivre sur la fonction rénale et l'action néphroprotectrice de l'huile essentielle et l'extrait de <i>Petroselinum crispum</i>	<b>125</b>
Conclusion et perspectives	
Références bibliographiques	
Annexes	
Publication	

## Introduction

Le cuivre est un oligo-élément nécessaire pour l'ensemble des voies métaboliques et aussi impliqué dans leur régulation. Bien que le cuivre ait une valeur médicinale considérable, le maintien de niveaux adéquats de cuivre dans le corps est d'une importance vitale car l'excès de ces oligo-éléments essentiels est connu pour causer divers problèmes de santé (Avinash et *al.*, 2018).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité induite par le cuivre. Certaines études ont rapporté qu'un taux élevé du cuivre dans l'organisme humain pourrait constituer un signe de toxicité en engendrant des radicaux libres de l'oxygène, la peroxydation lipidique et la modification des protéines et menant par la suite inéluctablement à une hémolyse, des troubles gastro-intestinaux, des lésions hépatique, rénale et splénique (Lee et *al.* , 2016 ; Zhou et *al.* , 2019) , le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'athérosclérose et des troubles neurologiques (Espín et *al.*,2014) .

Le coût onéreux des traitements proposés par la médecine moderne chez les personnes intoxiquées au cuivre (des expositions professionnelles), en plus d'effets secondaires gênants, et le suivi médical coûteux (prélèvements sanguins, dosages sériques de cuivre et de protéines, tests hépatiques) constituent les principales limites rencontrées lors du traitement (Papa Gallo ,2012).

Ces limites peuvent justifier la recherche de nouvelles approches thérapeutiques par l'utilisation de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle, Ainsi, nous nous sommes intéressés à la plante médicinale *Petroselinum crispum*, qui peut offrir une large réponse au problème de la toxicité au cuivre, et des perspectives thérapeutiques pour une meilleure prise en charge.

Il s'agit d'une plante culinaire importante qui appartient à la famille des Apiaceae originaire de la région méditerranéenne. Elle est cultivée depuis plus de 2000 ans, riche en vitamines C et E,  $\beta$  carotène, thiamine, riboflavine et minéraux organiques, ainsi que de nombreux composés chimiques actifs (Soliman et *al.*, 2015 ; Abou El-Leel et *al.*, 2017 ; Chaves et *al.*, 2011) .

Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que cette plante est composée essentiellement de flavonoïdes et composés phénoliques, en particulier l'apiine, l'apigénine et la 6-acétylapiine ; des huiles essentielles, dont la myristicine et l'apiol ainsi que les coumarines (Christian et *al.*, 2017).

On lui reconnaît de nombreuses propriétés : insecticide, anti-œstrogénique, anticancéreux, antioxydant et antimicrobiennes (Sabry et al., 2013 ; Tang et al., 2015 ; Sbai et al., 2016) , protecteur du cerveau (Soliman et al., 2015), antidiabétique, hépato-protecteur, des activités analgésiques, immunosuppressives, anti-plaquettaires, laxatives, diurétiques (Al-Hadi et al., 2013), gastro protectrices, spasmolytiques ( Mert et Timur , 2017) ,néphroprotecteur et anti-hyperlipidémique (Abdullah et al., 2016) .

L'enrichissement des connaissances en physiopathologie et l'intégration des concepts de la biologie moléculaire et cellulaire dans la recherche pharmacologique ont permis de développer des molécules dotées d'effets de plus en plus spécifiques, plus efficaces. La principale avancée dans ce domaine a porté sur l'apparition de nouveaux principes actifs possédant un mécanisme d'action innovant (Yassine et al., 2013).

Au cours des dernières décennies, et malgré la découverte de nouveaux composés en chimie de synthèse, les sources naturelles restent le principal fournisseur de nouveaux médicaments et de nouvelles structures chimiques. Nous assistons donc à un regain de la phyto-aromathérapie surtout pour les plantes riches en huiles essentielles et en polyphénols, principalement en flavonoïdes, qui ont montré des propriétés biologiques anti-oxydantes intéressantes (Kurek- Górecka et al., 2013; Georgiev et al., 2014 ; Ali et al., 2015 ) .

De nos jours, l'utilisation d'antioxydants naturels et divers substances phyto-chimiques a considérablement augmenté dans le monde (Hajji et al., 2018). Dans ce cadre, de nombreuses molécules anti oxydantes ont été proposées comme protectrices de la toxicité (Du et Lou, 2008 ; Vincent et al., 2013), mais des controverses existent encore sur les études cliniques. Cependant, à nos connaissances, les littératures rapportées sur l'effet protecteur du persil contre la toxicité du Cuivre sont encore limitées. Ainsi, la recherche des molécules protectrices contre cette toxicité constitue une voie d'exploration toujours ouverte.

Au vu de ces données, nous avons décidé de nous intéresser à l'effet protecteur de persil (*Petroselinum crispum*) contre la toxicité induite par le cuivre chez les rats Wistar.

Ce manuscrit est organisé en trois grandes parties dont la première est une revue bibliographique faisant le point sur la toxicité du cuivre et les vertus thérapeutiques de persil (*Petroselinum crispum*), la seconde partie décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental *in vitro* et *in vivo* , une troisième et dernière partie présente les résultats qui y sont discutés et confrontés à ceux d'autres auteurs. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

## **Chapitre I : Toxicité du Cuivre et pathologies associées**

### **I.1.Fonction biologique**

Le cuivre (Cu) est un micro-élément essentiel dont tous les organismes vivants ont besoin pour leur croissance, leur développement et leur survie (Chellan et Sadler, 2015). En ce qui concerne la santé humaine, le cuivre est impliqué dans de nombreuses fonctions corporelles nécessaires aux processus fondamentaux de l'organisme comme la respiration, l'éradication des radicaux libres, la production d'énergie, la formation des tissus conjonctifs, le métabolisme de l'oxygène et du fer, la maturation de la matrice extracellulaire et des neuropeptides, la signalisation neuroendocrine (Fraga, 2005 ; Chellan et Sadler, 2015). La recherche sur la toxicité aiguë ou chronique du cuivre en raison d'une carence ou d'un excès de cuivre se développe rapidement et l'intérêt pour le sujet est omniprésent (Alghobashy *et al.*, 2018 ; Shimberg *et al.*, 2017).

Un corps sain de 70 kg contient environ 100 mg de cuivre. De ce nombre, environ les deux tiers du cuivre total du corps se trouvent dans le squelette et les muscles, mais les concentrations les plus élevées se trouvent dans le foie, suivi du cerveau, des reins, la rate et du cœur (Ward *et al.*, 2003 ; Cholewińska *et al.*, 2018).

Grâce aux progrès des sciences médicales, le cuivre a suscité beaucoup d'intérêt. Le rôle important du cuivre est catalytique et il agit comme cofacteur pour de nombreuses enzymes comme la superoxyde dismutase (Cu/Zn) une protéine cytosolique qui accélère la dismutation du superoxyde, la cytochrome c oxydase (le porteur d'électron mitochondrial terminal), tyrosinase (située dans les mélanocytes et impliquée dans la transformation de la tyrosine en mélanine), céruloplasmine (une glycoprotéine plasmatique qui peut fonctionner comme transport du cuivre et comme antioxydant), lysyl oxydase (responsable de la désamination oxydante de la peptidyl lysine), etc. De même, il agit également comme ligand pour diverses autres protéines nécessaires à la respiration, au transport du fer et au métabolisme, à la croissance cellulaire et à l'hémostase (Puig et Thiele, 2002 ; Bertini *et al.*, 2010).

De plus, le cuivre joue également un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques des systèmes nerveux, hématologique, cardiovasculaire, reproducteur et

immunitaire (Cerone et *al.*, 2000). Sharma et ses collaborateurs (2005) ont proposé que le cuivre favorise le développement approprié des anticorps et des globules blancs, en plus de la production d'enzymes anti-oxydantes.

La présence du cuivre dans notre organisme est cruciale pour une vie saine, car il joue un rôle clé dans le processus métabolique normal, qui est associé aux acides aminés et aux vitamines. C'est le troisième minéral le plus répandu dans l'organisme et il est surtout transporté par la protéine plasmatique sanguine, la céruloplasmine. Le cuivre ne peut pas être produit par l'organisme et doit donc être ajouté à partir de sources alimentaires externes. Les divers aliments qui contiennent une quantité considérable de cuivre comprennent principalement la viande, les fruits de mer, les haricots, les grains entiers, la farine de soja, le son de blé, les amandes, les avocats, l'orge, l'ail, les noix, l'avoine, la mélasse en forme de bande noire, les betteraves et les lentilles. Certains rapports suggèrent que le cuivre peut également pénétrer dans le corps humain par l'eau potable à travers les tuyaux et ustensiles de cuisine en cuivre. Les huîtres sont la source la plus riche (Sharma et *al.*, 2005).

Le cuivre étant un métal essentiel à la vie, le maintien de sa teneur adéquate selon les normes proposées par divers organismes nationaux et internationaux de l'alimentation et de la santé est d'une importance vitale et hautement réglementé. Le cuivre est absorbé par l'alimentation, principalement dans le duodénum, bien qu'il ait également été proposé qu'une certaine absorption ait lieu dans l'estomac et dans la partie distale de l'intestin. De plus, un autre processus du métabolisme du cuivre est très complexe et médié par de nombreuses protéines (Hordyjewska et *al.*, 2014).

Cependant, le dysfonctionnement du métabolisme du cuivre conduisant à son excès ou à son carence entraîne des troubles aigus et sévères chez l'être humain (Cerpa et *al.*, 2005). Des études approfondies, y compris les plus récentes, ont révélé que le cuivre a de nombreux effets négatifs sur la santé humaine qui entraînent divers troubles tels que l'anémie, la leucopénie et la myélo-neuropathie (Wazir et Ghobrial, 2017), la démence Alzheimer (Xu et *al.*, 2017), etc. Cependant, la concentration excessive de cuivre dans l'organisme provoque une toxicité qui entraîne la maladie de Wilson et la maladie de Menkes (Hordyjewska et *al.*, 2014).

## **I.2. Cuivre : Un métal utilisé en médecine**

De nombreux rapports indiquent que l'utilisation du cuivre par les civilisations humaines remonte à environ 5 000 ans avant Jésus-Christ. Selon un article publié dans le journal "The Telegraph", le cuivre a été utilisé pour stériliser les blessures à la poitrine et l'eau potable en Egypte, et il a été mentionné dans The Smith Papyrus, le texte médical égyptien écrit vers 2600 avant Jésus-Christ. En outre, les Grecs, les Romains et les Aztèques utilisaient également le cuivre métal ou ses composés pour le traitement des infections chroniques et pour l'hygiène en général. De même, il existe un rapport dans l'ancien texte ayurvédique indien Charaka Samhita (300 avant Jésus-Christ) selon lequel le cuivre tue les microbes mortels, y compris son rôle dans la purification d'eau potable (The Telegraph 2012).

Depuis l'époque pré-védique, le cuivre est connu sous le nom de Tamra et il faisait partie des fonctions quotidiennes de subsistance. De plus, c'est le métal le plus ancien connu et utilisé pour la préparation des métaux d'alliage laiton et bronze plus forts dont il est un composant. Comme décrit dans Charaka Samhita, différentes formulations de "Tamra" (cuivre) peuvent être utilisées efficacement pour le traitement d'un large éventail de maladies telles que les hémorroïdes, l'anémie ferriprive, l'asthme, la lèpre et les maladies du foie, etc. Aussi, "Tamra Bhasma" est utilisé comme un médicament efficace dans le traitement de nombreuses maladies avec des doses normales dans la gamme de 15-60 mg (Galib et *al.*, 2011).

## **I.3. Recommandations alimentaires pour le cuivre**

Comme nous l'avons déjà mentionné, le cuivre est un oligo-élément essentiel requis dans des proportions adéquates pour une bonne santé humaine. Dans ce contexte, L'apport en cuivre varie considérablement d'une personne à l'autre, selon les choix alimentaires et les habitudes alimentaires, ainsi que les facteurs environnementaux. La plupart des régimes alimentaires contiennent suffisamment de cuivre (1-5 mg) pour prévenir une carence et pas assez pour causer une toxicité. Aux États-Unis, les apports alimentaires ou nutritionnels de référence (recommandés) pour le Cu sont basés sur les recommandations de l'Institute of Medicine du Food and Nutrition Board de 0,9 mg/j pour les adultes des deux sexes, 19-70 ans (Food and Nutrition Board, 2006, Trumbo et *al.*, 2001).

L'apport maximal tolérable dans le même groupe d'âge est de 10 mg/jour. L'eau potable représente environ 6 à 13 % de l'apport quotidien moyen de cuivre. L'Agence des États-Unis sur la protection de l'environnement (2013) a fixé les concentrations maximales pour le Cu à

1,3 mg/L ou 1,3 ppm. Ce montant est basé sur les risques possibles pour la santé et l'exposition au cours d'une vie, avec une marge de sécurité suffisante pour prévenir les problèmes de santé potentiels. Il est plus difficile de déterminer l'apport maximal de Cu en raison des conséquences sur la santé d'une carence et d'un excès de cuivre (Stern, 2010).

Le cadre réglementaire pour l'évaluation des risques liés aux oligo-éléments essentiels introduit par le Programme international sur la sécurité chimique a proposé un modèle homéostatique pour déterminer la gamme adéquate de la prise orale d'oligo-éléments essentiels. Les données disponibles suggèrent que l'apport maximal de cuivre doit être réévalué et qu'il est d'une importance critique de développer les bases scientifiques d'un apport maximal tolérable de Cu et de carence en cuivre (De Romaña et al., 2011).

#### **I.4. Absorption, distribution et métabolisme du cuivre**

##### **1.4.1. Absorption et distribution du cuivre**

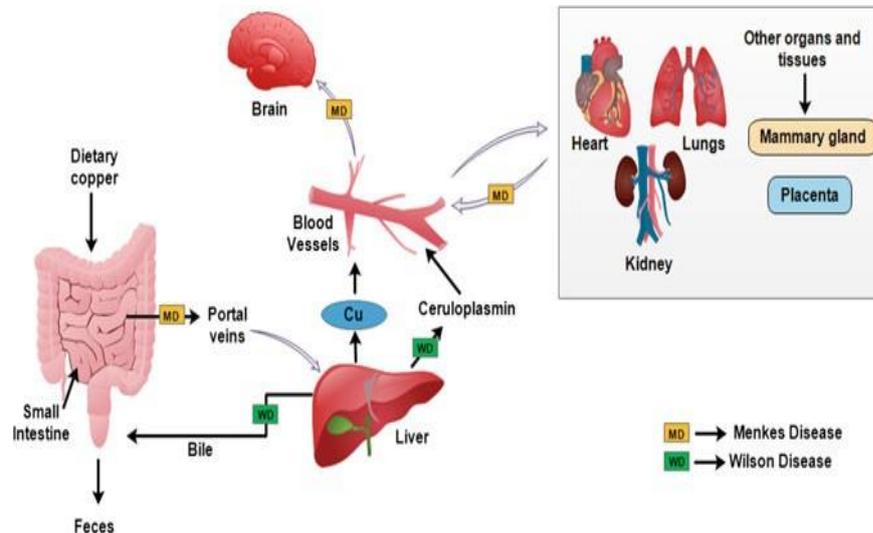
Chez l'homme, environ 30 à 50 % du Cu ingéré, principalement sous forme de  $\text{Cu}^{++}$ , est absorbé dans l'intestin grêle et de très petites quantités sont absorbées dans l'estomac (Turnlund et al., 1997). La principale voie d'entrée du cuivre dans la cellule à partir du sang est le transporteur du cuivre (CTR) (Maryon et al., 2007 ; Kim et al. , 2008).

Diverses études nutritionnelles et biochimiques ont porté sur le mécanisme d'absorption et le métabolisme du cuivre. Plusieurs études génétiques et biochimiques ont également été menées sur l'identification des différentes protéines qui jouent un rôle vital dans l'absorption, l'exportation et la distribution du cuivre. Il s'agit notamment des transporteurs CTR1 (transporteur high affinity), CTR2 (transporteur low affinity), transporteur de flux de cuivre, notamment ATP7A et ATP7B, et chaperons de cuivre (Gupta et Lutsenko, 2009).

Ces transporteurs membranaires, identifiés chez la levure, les plantes, les humains et autres mammifères, contiennent plusieurs sites riches en méthionine à leurs extrémités N et des résidus de cystéine et d'histidine conservés à leurs extrémités C (Puig and Thiele, 2002 ; Maryon et al., 2007 ; De Feo et al. , 2007).

Après absorption dans l'intestin, le cuivre est sécrété dans la circulation sanguine et lié à l'albumine, aux complexes de cuivre histidine (de faible poids moléculaire) et à la transcupréine. Lorsqu'ils atteignent le foie, les hépatocytes absorbent rapidement le cuivre par le récepteur du cuivre hCTR1 (De Romana et al., 2011 ; Hordyjewska et al., 2014).

La solubilité et la disponibilité du cuivre sont améliorées par les anions acides du milieu, les anions nitrate et sulfate, l'histidine, la méthionine, le lactose et l'amidon probablement après son hydrolyse en glucose (Stern et al., 2007).



**Figure 1 :** Représentation schématique de la répartition globale du cuivre dans le corps (Avinash et al., 2018) .

#### I.4.2. Métabolisme du cuivre

Le cuivre joue un rôle crucial dans le métabolisme humain, car il permet à de nombreuses enzymes de fonctionner correctement (Harris, 2001). Le cuivre est important pour le maintien des tissus épithéliaux et conjonctifs dans tout le corps, de la résistance de la peau et des vaisseaux sanguins. Il joue également un rôle important dans la production de mélanine, de myéline et d'hémoglobine et le maintien des fonctions normales de la glande thyroïde (Groff et al., 1995 ; Osredkar et Sustar, 2011).

Le cuivre est absorbé dans l'intestin et transporté au foie où il se lie à l'albumine. Le cuivre pénètre dans la circulation sanguine par la céruloplasmine (Cp), où le métabolisme du cuivre est contrôlé et excrété dans la bile (Cousin, 1985 ; Harris, 1991 ; Kim et al., 2008) . Cp est une N-glycoprotéine qui se lie à 6-9 atomes de cuivre, et six d'entre eux sont étroitement liés dans les centres actifs, tandis que les autres sont faiblement associés à la chaîne peptidique (Zaitsev et al.,1991) .Il est possible que le cuivre, qui a été inséré dans le Cp, soit sécrété de nouveau dans la circulation sanguine et distribué aux organes(Ramos et al.,2016).

Une protéine de transport, à savoir le transporteur à membrane de cuivre 1 (CMT1) sur les cellules de l'intestin grêle, transporte le cuivre à l'intérieur de la cellule, où une partie du

cuivre est transportée par les protéines de transport du cuivre (ATOX1) au réseau de Golgi et une partie du cuivre se lie aux métallothionéines. Lorsque la concentration de cuivre augmente, les enzymes ATP7A libèrent du cuivre dans le foie. De plus, l'enzyme ATP7B dans les cellules hépatiques est liée à la céruloplasmine avec le cuivre et le libère dans le sang. L'excès de cuivre est éliminé par sécrétion dans la bile (Harris et *al.*, 1998 ; Osredkar et Sustar, 2011).

Le bon métabolisme du cuivre nécessite un équilibre approprié avec le zinc et le manganèse. Le zinc peut concurrencer le cuivre dans l'intestin grêle et interférer avec son absorption (Avinash et *al.*, 2018).

### **I.5. Régulation centrale et stockage du cuivre : Troubles liés à la toxicité de cuivre**

Les enzymes ATP7A et ATP7B sont très abondants dans le foie, mais les perturbations de leurs fonctions de transport affectent le système nerveux central (SNC). En revanche, une pompe ATP7B mutante entraîne une toxicité du cuivre dans la maladie de Wilson autosomique récessif. Ces maladies cérébrales suggèrent que l'homéostasie du cuivre dans le foie est essentielle au fonctionnement normal du cerveau (Kaler, 2013 ; Yahata et *al.*, 2017) .

Outre leur importance dans le flux et l'équilibre global du cuivre, ATP7A et ATP7B jouent un rôle critique dans le transport du cuivre entre les compartiments intracellulaires. Dans les hépatocytes, ATP7A et ATP7B se trouvent principalement dans le réseau trans-Golgi et fournissent du cuivre destiné à être incorporé dans des enzymes dépendantes du cuivre telles que la tyrosinase, la peptidylglycine amidant mono-oxygénase, la dopamine mono-oxygénase, la lysyl oxydase, et la céruloplasmine (Scheiber et *al.*, 2017). À une concentration élevée de cuivre intracellulaire, les transporteurs sont transférés de façon réversible vers la membrane plasmique (ATP7A typiquement vers le basolatéral, ATP7B vers la surface apicale) où ils rejettent l'excès de cuivre de la cellule (Kaler, 2011).

Dans les aliments et l'eau, l'apport quotidien moyen de cuivre aux États-Unis est d'environ 1 mg, ce qui est relativement faible. La plupart des humains et des animaux sont capables de contrôler les quantités excessives de cuivre en diminuant leur absorption ou en augmentant leur excrétion. L'ingestion d'une quantité toxique de cuivre (> 10 mg/jour) ou une exposition aiguë ou chronique dans l'environnement, comme les risques professionnels, les accidents, les rejets des tuyaux de cuivre, affecte initialement le foie, le premier organe du dépôt de cuivre. De nombreux facteurs qui modifient le métabolisme du cuivre influencent l'évolution de

l'intoxication chronique au cuivre. La toxicité demeure sub-clinique jusqu'à ce que le cuivre stocké dans le foie soit libéré en quantités massives. La dose létale de cuivre est d'environ 10-20 g (Gaetke et Chow, 2003).

Les symptômes initiaux d'une toxicité aiguë du Cu peuvent être un goût métallique, des troubles gastro-intestinaux qui peuvent évoluer vers un collapsus cardiovasculaire, le coma et la mort en quelques heures. Les symptômes hépatiques apparaissent après 24 à 72 heures d'exposition et sont caractérisés par des élévations marquées des taux sériques d'aminotransférase, une insuffisance hépatique, une élévation du temps de prothrombine et un ictère. On a également signalé une érosion de la muqueuse épithéliale du tractus gastro-intestinal et une nécrose tubulaire aiguë du rein. Les concentrations sanguines de cuivre peuvent augmenter soudainement, entraînant une peroxydation des lipides et une hémolyse intra-vasculaire (Gaetke et Chow, 2003 ;Brewer, 2014).

Le foie absorbe le cuivre alimentaire du sang porte, synthétise les cuproprotéines dans les hépatocytes et sécrète l'excès de cuivre dans la bile. L'équilibre global du cuivre dans l'organisme est atteint par la régulation du taux d'absorption dans l'intestin grêle et de l'excrétion biliaire. Les régulateurs clés de ces processus sont les pompes ATP7A et ATP7B. Cependant, de nombreux autres composants de la machinerie d'homéostasie du cuivre ont été décrits, notamment la céruloplasmine, les petits transporteurs, les chaperons, les MT (Jack et al.,2016 ;Yahata et al.,2017;Scheiber et al.,2017;Calvo et al., 2017 ;Materia et al .,2011) .

Une régulation précise de l'homéostasie intracellulaire du cuivre est essentielle, ce qui est confirmé par le grand nombre de syndromes cliniques liés à un excès ou un déficit en cuivre(Yahata et al.,2017 ;Materia et al .,2011;Morrell et al .,2017 ).

Plusieurs études ont résumé les résultats d'approches génétiques, biochimiques et structurales concernant l'homéostasie cellulaire du cuivre et les troubles associés (Bhattacharjee et al.,2017 ; Inesi et al., 2014; Lutsenko, 2010) , mais l'ensemble du réseau d'événements qui régissent le transport et la disposition intracellulaire du cuivre n'a pas été entièrement étudiée. Comme Ctr1 ne peut pas transporter le cuivre bivalent, une partie du Cu(II) ingéré évite le foie et passe rapidement dans la circulation systémique où il peut cibler l'albumine (Lee et al., 2002).

Après l'entrée dans les hépatocytes, Cu(I) lie l'accepteur initial GSH, qui le transmet aux différents chaperons de cuivre, tel que Atox1, CCS et COX17, qui répartissent le cuivre en compartiments intracellulaires distincts (Bhattacharjee et *al.*, 2017) .

## **I.6. Rôle du cuivre dans la santé humaine**

Il a été observé que le cuivre en concentration adéquate agit en tant qu'un remède traditionnel pour de nombreuses maladies humaines, cependant, le déficit et l'excès de concentration de cuivre ont des effets négatifs et causent des problèmes de santé chez les êtres humains.

### **I.6.1. Pathologies associées à un excès de cuivre**

Comme la carence en cuivre entraîne divers troubles, son excès dans le corps humain s'est également avéré nocif pour l'être humain. Le mécanisme de l'homéostasie du cuivre est correctement régulé, cependant, l'échec de cette régulation entraîne plusieurs anomalies, causant ou favorisant le développement de la maladie. Récemment, des mécanismes liés au cuivre ont été suggérés comme cibles thérapeutiques pour des indications importantes comme le cancer (Blockhuys et Wittung-Stafshede, 2017) ,la défense microbienne (Neumann et *al.*,2017 ; Wiemann et *al.*,2017),l'inflammation pulmonaire chronique (Liu et *al.* ,2016), la grippe A (Cypryk et *al.*, 2017) ,les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP) et les maladies à prion ainsi que les maladies liées à l'homéostasie du cuivre comme la maladie de Menkes (MM) ou la maladie de Wilson (MW) (Bandmann et *al.*,2015 ;Viles, 2012),et autres maladies mettant la vie en danger comme le diabète et la toxicose de cuivre (Avinash et *al.*,2018), qui sont décrites ci-après .

#### **I.6.1.2. Maladie de Wilson (MW)**

MW est une maladie génétique autosomique récessive causée par des mutations invalidantes dans les deux copies du gène ATP7B, qui s'exprime différemment dans les tissus (ATP7B est exprimé dans la membrane TGN de l'hépatocyte) (Shim et Harris, 2003). Le gène ATP7B est responsable du transfert du cuivre dans la voie sécrétoire pour sa liaison au Céruloplasmine et son excrétion dans la bile (Brewer et *al.*, 2000).

On sait depuis longtemps que la maladie de Wilson se caractérise par l'accumulation de cuivre dans les tissus, en particulier dans le foie et le cerveau (Telianidis et *al.*,2013). La biosynthèse, le repliement, la localisation, la rotation et le réseau d'interaction protéique du mutant du transporteur de cuivre ATP7B le plus fréquent causant une accumulation toxique de cuivre dans la maladie de Wilson ont été récemment décrits(Concilli et *al.*,2016) .

Brewer et ses collaborateurs (2000) ont étudié les 26 cas de grossesse de 19 femmes atteintes de la maladie de Wilson, qui a été traitée au zinc comme seul médicament anti cuivre. Parmi les 26 nourrissons, 24 étaient normaux, un présentait une anomalie cardiaque pouvant être corrigée chirurgicalement et un autre présentait une anencéphalie. Les manifestations cliniques sont les lésions neurologiques et les maladies du foie, c'est-à-dire que les patients présentent surtout la mort du système nerveux (avec les signes neurologiques et aussi psychiatriques) et du foie. La cornée de l'œil est touchée, ce qui entraîne une décoloration marron caractéristique, très spécifique pour la maladie de Wilson neurologique, "l'anneau de Kayser-Fleischer" (Tapiero et *al.*, 2003).

Alors que la forme juvénile est principalement associée à des symptômes hépatiques, la forme adulte tend à se manifester principalement avec des déficits neurologiques (Lorincz ,2010). Dans la maladie de Wilson, la concentration de cuivre dans le foie est très élevée, alors que dans le sang, elle est très faible. Les taux de cuivre dans l'urine sont généralement plus élevés et ils sont utilisés comme bio-marqueur de la maladie. Dans un cerveau atteint, la teneur en cuivre est de deux à huit fois plus élevée que dans un cerveau normal (Faa et *al.*, 2001).

### **I.6.1. 3. Troubles non wilsoniens (toxicose du cuivre)**

Les troubles non wilsoniens causés par une accumulation excessive de cuivre, qui se produisent pendant la petite enfance, comprennent la cirrhose infantile indienne, la toxicose idiopathique du cuivre et la cirrhose infantile endémique du Tyrol. On croit que l'absorption accrue de cuivre par les aliments et l'eau potable est responsable du développement de ces maladies (Brewer, 2003a, b ; Wu *et al.*,2016).

Une telle condition résulte la maladie de Wilson, dans lequel il est bien connu qu'une légère accumulation de cuivre se produit sans qu'il y ait de problèmes médicaux avec l'ingestion naturelle de cuivre. Cette pathologie se développe lorsque la source habituelle de nutrition et/ou d'eau pour les nourrissons contient une forte teneur en cuivre. Le gène de la maladie de Wilson peut devenir dominant et s'exprimer à l'état hétérozygote (Butler et *al.*, 2001).

### **I.6.1.4. Maladie d'Alzheimer**

Il s'agit d'un désordre neuronal, où de multiples altérations dans divers processus cellulaires sont impliquées. Il s'agit d'un trouble associé à l'âge, caractérisé par la présence de plusieurs types de plaques amyloïdes et d'embrouilles neurofibrillaires, constitués principalement de protéine amyloïde-beta et de TAU hyper-phosphorylé. En ce qui concerne le rôle du cuivre dans cette maladie, l'altération de l'homéostasie des ions métalliques, dont le cuivre, joue un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Le cuivre contrôle l'activité excessive

des récepteurs N-méthyl-d-aspartate, les récepteurs des neurotransmetteurs excitateurs. Avec l'âge, le taux de cuivre augmente dans le plasma sanguin et le sérum et il est également élevé dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Eskici et Axelsen, 2012 ; Noda et *al.*, 2013).

L'augmentation de la teneur en cuivre est donc corrélée négativement avec la perte de cognition (Arnal et *al.*, 2013). De plus, on a signalé la présence d'une grande quantité de cuivre dans les plaques séniles du cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer. Certains rapports suggèrent qu'une concentration élevée de cuivre provoque l'homo-dimérisation de la protéine précurseur de l'amyloïde, entraînant l'agrégation amyloïde beta A $\beta$  et l'hyper-phosphorylation de la protéine TAU (Atwood et *al.*, 2000 ; Arnal et *al.*, 2013 ; Gonzalez-Dominguez et *al.*, 2014). Ces données corroborent les résultats antérieurs sur l'interaction à haute affinité entre Cu(II) et le site de liaison à l'histidine de A $\beta$  (Mital et *al.*, 2015), ainsi que le rôle de A $\beta$  comme piègeur synaptique de Cu(II) (Wezynfeld et *al.*, 2016) .

Le cuivre est un métal actif redox. Les altérations de l'homéostasie du cuivre peuvent créer des conditions favorables au super oxyde, ce qui entraîne des cycles redox et des dommages causés par le stress d'oxydation aux lipides polyinsaturés membranaires et des réactions neurochimiques d'origine redox dans le cerveau (Da Silva et *al.*, 2013 ; Gonzalez-Dominguez et *al.*, 2014).

#### **I.6.1.5. Maladies à prions**

La protéine prion PrPC principalement pliée en hélice  $\alpha$  est exprimée dans le système nerveux entérique, par exemple dans les fibres nerveuses entériques / terminales et la glie au sein des plexus sous-muqueux myentériques (cobayes, souris), ce qui suggère un rôle dans la régulation de la contractilité iléale (Martin et *al.*, 2012) .

D'autres rôles bénéfiques pour la PrPC peuvent découler de la découverte que le prion est un agoniste du récepteur Adgrg6 couplé à la protéine G, connu pour réguler la neuropathie liée à la démyélinisation (Küffer et *al.*, 2016 ; Wulf et *al.*, 2017).

Le cuivre a longtemps été associé à la formation d'une conformation de la protéine prion PrPSc enrichie en feuillets  $\beta$  résistante à la protéase, qui a été considérée comme l'étape critique des maladies neuro-dégénératives à prions appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (Viles, 2012 ; Yen et *al.*, 2016) .

Récemment, Giachin et *al.*, 2015 ,ont proposé l'existence d'un site de liaison au cuivre non octarépétitive de la PrPC qui passe à la PrPSc infectieuse dans des conditions acides. La seule maladie à prion connue observée chez les animaux sauvages est la maladie débilitante

chronique (MDC). Le magnésium et le cuivre alimentaires ont été associés à des événements inflammatoires dans la pathogenèse de MDC (Nichols et *al.*, 2016). Les maladies à prions partagent les caractéristiques des maladies neuro-dégénératives "de type prion" en termes d'implication des protéines ( $\alpha$ -synucléine, amyloïde  $\beta$ ), et formant des dépôts amyloïdes (Toni et *al.*, 2017).

#### **I.6.1.6. Maladie de Parkinson(MP)**

Il est prouvé que les altérations de l'homéostasie du cuivre jouent un rôle dans la mort cellulaire neuronale et l'agrégation de l'  $\alpha$  -synucléine (Okita et *al.*, 2017 ; Davies et *al.*, 2016). Il convient de noter dans ce contexte que l'épuisement des GSH (Liddell et White, 2017) est un symptôme très précoce dans le cadre de la maladie de Parkinson (Mischley et *al.*, 2016) . La formation de fibres amyloïdes dans le diabète de type 2 (Sinopoli et *al.*, 2014) peut également faciliter la maladie de Parkinson, en raison de l'accélération de la formation d'amyloïdes  $\alpha$ -synucléine par le polypeptide amyloïde amyline(Horvath et Wittung-Stafshede, 2016) .

La perturbation du rétromère, un complexe protéique hétérotrimérique, a été observé dans un certain nombre de maladies, dont la maladie de Parkinson (Small et Petsko, 2015), ce qui a entraîné une dérégulation de la récupération et du recyclage des protéines vitales (McMillan *etal.*, 2017). En fait, la récupération et le recyclage endosomale du transporteur de cuivre ATP7A sont dépendants du rétromère dans les cellules humaines (Steinberg et *al.*, 2013) .

#### **I.6.1.7. Diabète**

Le diabète est le résultat d'une altération de l'homéostasie du glucose. La régulation du cuivre devient défectueuse dans le cas des modèles non cliniques de diabète. Il s'agit de produits finaux à glycation avancée, qui peuvent transformer les résidus d'acides aminés produisant des sites pathologiques de liaison au cuivre dans les composants de la matrice extracellulaire des parois des vaisseaux sanguins (Cooper, 2012 ; Squitti et *al.*, 2017).

On croit qu'il se développe en raison d'un manque d'activité ferroxidase dans les tissus, ce qui entraîne une accumulation de fer dans le pancréas (Uriu-Adams et Keen, 2005).Cependant, on pense que le métabolisme du cuivre joue également un rôle direct ou indirect dans le développement de cette maladie (Takahashi et *al.*, 1996).

Dans le cas d'un patient diabétique, le foie et les reins présentaient une concentration élevée de métallothionéine. De plus, les ions de cuivre dans le sang peuvent augmenter le taux de formation du produit final glycosylé avancé, ce qui est associé à la pathogénicité des complications secondaires du diabète. La concentration de cuivre dans le plasma sanguin était

également élevée chez les patients diabétiques que chez les non-diabétiques. La concentration plasmatique élevée entraîne l'hypertension, la rétinopathie et des maladies micro-vasculaires (Uriu-Adams et Keen, 2005).

Dans les modèles cliniques et non cliniques de la maladie, des études sur l'excrétion urinaire de cuivre ont démontré une quantité excessive de cuivre libre chélatable chez les patients diabétiques (Ito et *al.*, 2001 ; Cooper et *al.*, 2005). Certains rapports suggèrent que la maladie d'Alzheimer et le diabète partagent des voies communes qui modifient le métabolisme du cuivre et du glucose. Les anomalies de la fonction mitochondriale, du glucose et du métabolisme du cuivre ont été signalées dans les deux maladies. Un récepteur pour les AGE(RAGE), un récepteur multi-ligand, joue un rôle clé dans le développement des voies inflammatoires du diabète et de la maladie d'Alzheimer (Perrone et Grant, 2015 ; Puqazhenthii et *al.*, 2017).

#### **I.6.1.8. Cancer**

Les altérations de la concentration des oligo-éléments ont un effet néfaste sur le métabolisme cellulaire et peuvent donc induire une cancérogenèse. Comme mentionné précédemment, le cuivre induit la production de ROS, le déséquilibre entre les ROS et les antioxydants peut entraîner des dommages directs à l'ADN, des mutations et le développement du cancer (Khoshdel et *al.*, 2016).

Certaines données suggèrent que les cellules cancéreuses ont généralement besoin d'une quantité élevée de cuivre par rapport aux cellules normales. Par conséquent, la thérapie anticancéreuse qui cible le métabolisme du cuivre peut être une meilleure option pour limiter la croissance du cancer (Easmon, 2002). Les patients souffrant de leucémie, de sarcome, de tumeur cérébrale, de cancers du poumon, du col de l'utérus, du foie et du sein présentent une teneur élevée en cuivre sérique. En particulier, dans les cancers du sein et de l'ovaire, le taux de cuivre peut être multiplié par deux ou trois (Pavlova et Thompson, 2016). Il est intéressant de noter qu'après la guérison de ces cancers, le taux sérique de cuivre est revenu à son niveau normal. Ce fait souligne l'importance d'une teneur élevée en cuivre dans le cancer (Brewer et *al.*, 2000 ; Nasulewicz et *al.*, 2004).

Il a été allégué que la perturbation de la teneur en cuivre entraîne la mutation du gène p53. Par conséquent, le cuivre déplace le zinc de son site de liaison normal présent à la p53, causant son mauvais pliage et son altération fonctionnelle (Sharif et *al.*, 2012 ; Khoshdel et *al.*, 2016). De plus, il est également suggéré que le cuivre provoque le cancer en induisant l'angiogenèse tumorale (Khoshdel et *al.*, 2016).

## **I.7. Chélationthérapie**

La restauration de l'homéostasie du cuivre est surtout pertinente pour la maladie de Wilson (MW) (Langley et Dameron, 2013 ; Katerji et *al.*, 2017), bien que les maladies neuro-dégénératives (Barnham et Bush, 2014 ; Soon et *al.*, 2011), ou inflammatoires (Liu et *al.*, 2016 ; Brewer, 2014) puissent également être liées.

Avant que la maladie ne progresse vers le foie et le cerveau (MW) ou les poumons (inflammation), l'excès de cuivre peut être limité par la réduction de Cu(II), l'addition de Zn(II) et l'administration de ligands chélateurs de Cu(II) tels que le tétrathiomolybdate (TM), la triéthylène tétramine (Trientine, TETA, Trien) ou la D-pényllamine (D-pen) (Langley et Dameron, 2013 ; Gaetke et Chow, 2003) pour limiter le cuivre en excès.

En raison de sa teneur élevée dans les tissus en prolifération, le cuivre peut également favoriser l'angiogenèse et le développement du cancer (Wang et *al.*, 2010). Par conséquent, la thérapie d'abaissement du Cu (II) présente également un potentiel dans le traitement du cancer (sein, colorectal, leucémie, poumon, prostate) par des composés chélateurs du cuivre. Une gamme de cibles et/ou de mécanismes d'action ont été suggérés pour l'activité antiproliférative des composés chélateur du Cu (II). Il s'agit notamment des inhibiteurs du protéasome et des inducteurs d'apoptose (Daniel et *al.*, 2005), des interactions ADN et protéines (Bisceglie et *al.*, 2007 ; Lian et *al.*, 2016), de la génération de ROS (Gupte et Mumper, 2007), du stress oxydatif (Kirshner et *al.*, 2008), la régulation à la hausse de l'intégrine  $\beta 4$  (Fan et *al.*, 2010), de la formation du complexe cuivreux à base de Schiff ( Lian et *al.*, 2016 ; Chakraborty et *al.*, 2010).

Compte tenu de l'activité redox des chélateurs de Cu(II) anticancéreux potentiels (Santini et *al.*, 2014 ; Pape et *al.*, 2015), une conséquence possible est que le taux élevé de cuivre dans les tissus en prolifération pourrait également réduire le potentiel redox oxydant, ce qui pourrait augmenter la prolifération des cellules cancéreuses (Gupte et Mumper, 2009 ; Watson, 2014 ; Jorgenson et *al.*, 2013 ; Kim et *al.*, 2016) .

## **I.8. Utilisation des antioxydants**

Le stress oxydatif était l'hypothèse la plus utilisée expliquant les effets toxiques de cuivre. De nombreuses plantes ont été testées sur des modèles animaux contre cette toxicité dont le pourpier, le basilic tulsi , le chou rouge , le ginseng américain (Panax quinquefolium) , etc ;

(Ramzani Ghara et Ezzati Ghadi , 2018 ; Chandra et *al.* , 2016 ; Abdel-Halim et *al.* , 2015 ; Abdel-Tawwab , 2015 ) .

De nos jours, l'utilisation d'antioxydants naturels et divers molécules phyto-chimiques a considérablement augmenté dans le monde. Le pouvoir antioxydant des molécules peut être évalué soit *in vivo*, sur des organismes vivants, soit *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique (Alam et *al.* , 2013).

Le persil, ou *Petroselinum crispum*, est l'une des plantes médicinales, riche en flavonoïdes et composés phénoliques, coumarines, vitamines (E, K, C), minéraux, chlorophylles, caroténoïdes, et les huiles essentielles qui présentent une activité anti-oxydante remarquable (Dobričević et *al.*, 2019).

Son utilisation pour protéger les êtres humains ainsi que les animaux contre la toxicité de cuivre n'a jamais été évaluée. Ainsi, la recherche des plantes médicinales protectrices constitue une voie de découverte très intéressante.

## **Chapitre II : Persil (*Petroselinum crispum*) et ses propriétés thérapeutiques**

### **II.1. Histoire du persil en phytothérapie**

*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill appartient à la famille des Apiacées ou Umbellifère et au genre *Petroselinum*. Du grec *petros*, pierre et de *selinon*, ache. *Petroselinon* veut donc dire : ache des rocailles. Les Grecs anciens mentionnent que cette plante poussait sur les rocailles macédoniennes (Papuc et *al.*, 2016) .

*Petroselinum crispum* serait originaire de Sardaigne (région méditerranéenne) et aurait été cultivé à partir du IIIe siècle av. J. Linnaeus, un naturaliste suédois, a déclaré que son habitat sauvage était la Sardaigne, d'où il a été amené en Angleterre et apparemment cultivé pour la première fois en Grande-Bretagne en 1548. Depuis son introduction au XVIe siècle, il a été complètement naturalisé dans diverses régions d'Angleterre et d'Écosse, sur de vieux murs et rochers (Agyare et *al.*, 2017) .

Dans l'Antiquité, le persil n'était pas seulement utilisé à des fins culinaires et médicales, il était soumis à une grande variété de croyances superstitieuses par les Grecs et les Romains. Les Grecs anciens utilisaient principalement le persil comme décoration pour les couronnes funéraires en l'honneur des gagnants des jeux de l'isthme de Corinthe (Tucker et DeBaggio, 2009).

Selon certains historiens, les Romains utilisaient le persil pour désodoriser les cadavres, masquer les odeurs de l'alcool après les orgies (Agyare et *al.*, 2017) . Le persil était apprécié pour ses propriétés médicinales bien avant d'être accepté comme aliment ou épice. A la Renaissance, l'huile essentielle de persil (*Petroselinum crispum*) a été utilisée comme un puissant antiépileptique, emménagogue et circulatoire. Cependant, le persil frais a été utilisé comme un remède aux affections urinaires, spasmodiques, néphrétiques, la leucorrhée et diurétique (Gilles, 2014).

Il a probablement été consommé pour la première fois en Europe au Moyen Âge. La variété à feuilles plates n'a pas été consommée au départ parce qu'elle était facilement confondue avec le faux persil (la petite ciguë : *Aethusa cynapium*). Cependant, la variété à feuilles frisées a rapidement retrouvé sa place dans les assiettes et les plats puisqu'elle a la capacité de nettoyer l'haleine et le palais (Agyare et *al.*, 2017). Elle a rapidement été utilisée couramment comme garniture dans une grande variété de plats. Elle est commercialisée sous forme fraîche et séchée (Rayment, 2016 ; Grieve, 2014).

Aujourd'hui, la médecine attribue au persil des vertus thérapeutiques curatives et dépuratives diverses. C'est un stimulant, un diurétique et un anti-infectieux. Le persil élimine les toxines et redonne de l'élasticité aux vaisseaux sanguins (Jesus, 2017). Selon ANSM, 2019 ; *Petroselinum crispum* est classé dans la liste A des plantes médicinales qui sont utilisées traditionnellement.

## **II.2. Origine et répartition géographique**

Le persil est probablement originaire de la Méditerranée occidentale. Il est présent naturellement dans la plupart des pays méditerranéens (y compris en Afrique du Nord) et dans de nombreux pays tempérés. Le persil est une culture ancienne, qui était déjà bien connue en Grèce et à Rome. Il est largement cultivé pour ses feuilles dans la plupart des pays méditerranéens, en Europe et en Amérique du Nord. Dans les tropiques, y compris en Asie du Sud-Est, il est cultivé à petite échelle à des altitudes plus élevées. Les formes à racine pivotante comestible épaissie sont d'origine récente et se sont probablement développées vers 1500 après Jésus-Christ dans le nord de l'Allemagne. Leur culture est concentrée dans le nord-ouest et l'est de l'Europe et parmi les Nord-Américains originaires de cette région (Yanardag et al., 2003). En Afrique, *P. crispum* est cultivé comme une plante médicinale, utilisé dans le traitement des maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (Gadi et al., 2009).

## **II.3. La description botanique du persil**

Le persil (*Petroselinum crispum*), comme beaucoup d'autres plantes issues de la grande famille des Apiacées (ex-Ombellifères), est une plante bisannuelle à forte racine pivotante, épaisse, blanche et charnue, qui pousse sur des sols riches et frais. Elle porte des tiges robustes et finement striées. Ses feuilles, vertes foncées et glabres, dentées ou frisées, sont divisées en trois segments. Lors de la seconde année, de grandes ombelles de fleurs jaunes à verdâtres se développent au sommet des hampes florales, ce qui permet à la plante d'atteindre une hauteur maximale de 80 cm. Après la floraison, des graines aromatiques apparaissent (Gilles, 2014). Elles sont ovoïdes, de 2 à 3 mm de long, très riches en huiles essentielles (Chauhan et Aishwarya, 2018). La culture du persil demande une exposition à la fois ensoleillée et semi-ombragée. Il se cultive sur des sols riches et légers. Plante herbacée aromatique des climats tempérés, le persil se cultive facilement dans les jardins potagers, dans les jardinières et même en appartement (Jesus, 2017).

## II.4. Classification et systématique

Selon Chauhan et Aishwarya ,2018 ; la classification qu'occupe *Petroselinum crispum* dans la systématique est présentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1** : Classification de *Petroselinum crispum* (Chauhan et Aishwarya ,2018)

Nom scientifique et (Nom commun)	
Division	Magnoliophyte (plantes à fleurs)
Super division	Spermatophyte (Semences)
Classe	Magnoliopside (Dicotylédones)
Ordre	<i>Petroselinum crispum</i>
Famille	Apiaceae / Umbelliferae
Genre	<i>Petroselinum J. Hill</i> (Persil)
Espèce	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A.W. Hill (Persil)
Synonymes	Persil des jardins, persil odorant
Nom vernaculaire :	Maâdnous, imzi



**Figure 2** : Feuilles, graines et racines de *Petroselinum crispum* (Chauhan et Aishwarya ,2018)

## II.5. Utilisations ethno-médicinales

D'après une étude réalisée par Farzaei *et al.* , 2013, des informations complètes ont été recueillies de 1966 à 2013 dans différents pays sur les utilisations ethno-médicinales du persil, son utilisation est largement répandue comme légume vert et garniture, il est aussi utilisé à différentes fins médicinales traditionnelle.

**Tableau 2 :** Utilisations ethno-médicinales du *Petroselinum crispum*

Région	les Parties de la plante utilisées	Usages traditionnels et rapports ethnobotaniques
Iran	les semences	Les troubles gastro- intestinaux et carminatifs, antispasmodique, digestif, astringent, gastrotonique, anti -inflammatoire, antidote, halitose, calculs rénaux et aménorrhée, antimicrobien, sédatif
	les feuilles	Arôme alimentaire, exanthème, macula, refroidisseur de tête, reniflement, otite, antitussif, diurétique, calculs rénaux, hémorroïdes, troubles gastro-intestinaux, performances visuelles et dermatites
Irak	les feuilles	Les maladies dermatologiques
Turquie	les feuilles	anticoagulant, hypertension, hyperlipidémie, hépato toxicité et diabète
Chine	Les semences	Diurétique
	les feuilles	Arôme alimentaire
Maroc	les feuilles	Hypertension artérielle, diabète, maladie cardiaque, maladie rénale, lumbago, hypertension artérielle, eczéma et saignement de nez ,Aménorrhée, dysménorrhée, insuffisance rénale
Espagne	les feuilles	Prostatite, diabète, halitose, avortement, anémie, hyperuricémie, constipation, odontalgie, douleur, calvitie, hypertension,
Italie	la partie aérienne	Abortif
Pérou	les semences	Carminative et gastrite
Serbie	les feuilles	Maladie des voies urinaires

## II.6. Analyses phyto-chimiques

Les progrès réalisés dans la connaissance de la structure des cibles biologiques et dans la modélisation de leur interaction avec des effecteurs ont suscité de la part des chimistes un intérêt tout particulier pour ce qui concerne la recherche de nouveaux composés à visée thérapeutique. La composition de persil est variable selon différents facteurs : la variété, le génotype, le climat, la période de récolte, le stockage, la transformation et le traitement (Butnariu et Butu ,2015 ; García-Carrasco et *al.*, 2015 ; Lee et *al.* ,2011 ).

Actuellement , 39 composants ont été identifiés pour les HE.s (Amr et *al.* , 2018) ; et 80 pour le persil frais par les méthodes d'analyse modernes : Criblage phyto-chimique, chromatographie sur couche mince (CCM), en phase gazeuse et liquide, spectrométrie de masse. La composition de persil frais diffère de celle de l'huile essentielle (tableau 4 et 6).

### II.6.1. Criblage phyto-chimique

Selon Al-Haadi et *al.*, 2013, l'extrait alcoolique (éthanol) des feuilles de *Petroselinum crispum* est composé essentiellement des alcaloïdes , carbohydrate , composés phénoliques, tanins , flavonoïdes ,protéines et saponines .

**Tableau 3 :** Composition de l'extrait alcoolique (éthanol) des feuilles de *Petroselinum crispum* (Al-Haadi et *al.*, 2013)

Constituants	Résultats
-Alcaloïdes	+
-Carbohydrate	+
-Composé phénolique et tannins	+
-Flavonoïdes	+
- protéines	+
-Saponines	+
-Lipides/ acides gras	-
-Anthraquinone	-

+ = présent, - = absent

### II.6.2. Identification chromatographique et spectroscopique

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle ou d'un extrait végétale reste le profil chromatographique (INSA, 2015). Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits chimiques ajoutés ou d'allergènes.

Les essences et les extraits végétaux représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps (Petko , 2010) .

**Tableau 4:** Teneurs en polyphénols de persil déterminée par HPLC (Hozayen et al., 2016 ; Marwa, 2019)

Famille	Constituants	mg/g extrait
<b>Phénols</b>	Acide Gallique	4.276
	Acide p-hydroxy -benzoïque	9.631
	Acide vanillique	10.923
	Caféine	11.230
	Vanilline	12.911
	Acide p-Coumarique	14.418
	Acide Férulique	15.458
	Catéchol	8.052
	Acide benzoïque	17.413
	Acide o-Coumarique	18.138
	Acide Cinnamique	22.793
<b>Flavonoïdes</b>	Luteo.6-glucose8-arabinose	
	Apig.6-rhaminose8-glucose	
	apig.6-glucose8-rhaminose	
	naringine	
	Rutine	
	hespiridine	
	Acide rosmarinique	
	apig.7-o-o-neohespiroside	
	apiginine-7-glucose	
	quercétine	
	quercitine	
	naringénine	
	hespirtine	
	kampférol	
apigénine		

**Tableau 5 :** Dosage des polyphénols et flavonoïdes (Marwa, 2019)

	Rendement (g%)	Polyphénols (eq/g extrait)	Flavonoïdes (eq/g extrait)
<i>Petroselinum crispum</i>	17.86	99.84	30.86

**Tableau 6:** Composition chimique de l'huile essentielle de persil par CPG/SM (Gilles, 2014)

<b>Famille</b>	<b>Composés identifiés</b>	<b>Quantité</b>
<b>Monoterpène</b>		
	-Alpha-pinène	4-16%
	-Béta-pinène	3-17%
	-Myrcène	4-5%
	-Béta-phellandrène	13-14%
	-Terpinolène	3-5%
	-P-menthatriène	28-50%
<b>Alcools terpénique</b>		
	-Linalol	4-6%
<b>Ethers-oxydes</b>		
	-Myristicine	5-40%
	-Apiol	14-30%
	-Elémicine	2-3%
<b>Phényl-propanes</b>		
		3-4%
<b>Rendement</b>		0.02-6%

**Tableau 7 :** Composition chimique d'autres substances bioactives identifiées dans le persil (Farzaei et al., 2013 ; Hozayen et al., 2016 ; Dobričević et al., 2019)

<b>Famille</b>	<b>Constituants</b>
<b>Chlorophylles</b>	-Chlorophylle a -Chlorophylle b
<b>Caroténoïdes</b>	-β-carotène (précurseur de la vitamine A) -lutéine -xanthophylles : violaxanthine, néoxanthine
<b>Coumarines</b>	-Oxypeucedanin -Psoralen -8-Methoxypsoralen -5-Methoxypsoralen -Imperatorin -Isoimperatorin
<b>Vitamines</b>	-tocophérol -acide ascorbique -vitamine B, k -Riboflavine -niacine
<b>Minéraux</b>	-Fe, Mg, Mn, P, K, Ca, Na et Zn

### II.6.3. Composition nutritionnelle

Selon Anses, 2017, la composition nutritionnelle et apport calorique en moyenne pour 100 g de persil sont donnés dans le tableau suivant :

**Tableau 8 :** Composition nutritionnelle et apport calorique en moyenne pour 100 g de persil (Anses, 2017)

Constituants	Quantité
Eau	85.5g
Glucides	3.84 g
Sucre	0,95 g
Fibres alimentaires	4,3 g
Lipides	0,63g
Protéines	3,63 g
<b>Vitamines</b>	
Provitamine A Béta-carotène	5050 µg
Equivalent Vitamine A	841.67 µg
Vitamine B	2.44 mg
Vitamine C	177 mg
Vitamine E	1.73 mg
<b>Minéraux et oligo-éléments</b>	
Calcium	218 mg
Cuivre	0.12 mg
Fer	4.67 mg
Iode	5 µg
Magnésium	39.5 mg
Manganèse	1.7 mg
Phosphore	65 mg
Potassium	598 mg
Sélénium	0.1 µg
Sodium	54.3 mg
Zinc	0.77 mg
<b>Polyphénols</b>	
Autres polyphénols	13.95 mg
Polyphénols totaux	13.95 mg
<b>Apport calorique</b>	42.7 Kcal

D'après plusieurs études, les constituants de persil qui lui confèrent son activité pharmacologique sont :

- Les phénols.
- Les flavones, les flavonols et les flavonones, communément appelés les flavonoïdes.
- les huiles essentielles

- les chlorophylles et les caroténoïdes
- les coumarines
- les vitamines et les minéraux

Les polyphénols identifiés dans le persil sont principalement :

- les flavonoïdes tel que l'apigénine, l'apiin, 6"-Acetylapiin, lutéoline, naringénine, chrysoeriol, quercétine, Kaempferol, isorhamnetin, oxypeucedanin hydrate, cnidilin, isoimperatorin, diosmetin, 7-O- $\beta$ -D-glucopyran oside, myristicine et apiol. On dénombre dans le persil 16 flavonoïdes (Farazaei *et al.*, 2013 ; Hozayen *et al.* , 2016) .

-les phénols : l'acide caféique (au fort pouvoir antioxydant), l'acide cinnamique (antiseptique et antifongique), l'acide benzoïque, l'acide o-coumarique ainsi que l'acide férulique (puissant antioxydant et anti-inflammatoire) (Agra *et al.* , 2006) .

La teneur totale en polyphénols est directement influencée par le génotype, les conditions de croissance (sol et température) et l'interaction entre le génotype et les conditions de croissance (Butnariu et Butu ,2015 ; García-Carrasco *et al.*, 2015 ; Lee *et al.* ,2011 ) .

Les flavonoïdes, les chlorophylles et les caroténoïdes sont des pigments hydrosolubles, confèrent au persil de multiples propriétés biologiques (anti-oxydante, antimutagènes, anti-cancérigène, anti-inflammatoires et antiviraux, etc.) (Dobričević *et al.* , 2019 ; Bahare *et al.* , 2019 ) . Le persil est une source des huiles essentielles (apiol et myristicine), coumarines, vitamines (A, C, K) et minéraux ; qui font de persil un puissant détoxifiant naturel, antioxydant et anti-inflammatoire (Farazaei *et al.*, 2013 ; Hozayen *et al.* , 2016).

## **II.7. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Petroselinum crispum***

L'évaluation des huiles essentielles doit prendre appui sur des référentiels techniques, notamment sur les Normes AFNOR, ISO ainsi que sur celles des Pharmacopées Française et Européenne, qui sont pour la plus part du temps estimée d'après leurs qualités organoleptiques, (odeur, goût, couleur, état) auxquelles s'ajoutent un certain nombre de constantes appelées indices qui ont fait l'objet d'étude statistique très importante (AFEDI, 2018).

### **II.7.1. Propriétés physiques (Ouis, 2015)**

#### **II.7.1.1. Caractéristiques organoleptiques du persil**

**Aspect :** Variable selon la partie utilisée, liquide huileux pour les graines et floconneux pour le persil frais.

**Odeur :** le persil a une odeur caractéristique différente de celle de la partie verte ; du fruit écrasé pour les HE.s des graines, et odeur de persil pour la plante fraîche.

**Couleur :** Très variable suivant la partie utilisée, allant du jaune à l'orange-marron.

#### **II.7.1.2. Détermination de pH**

Les huiles essentielles de persil sont acides (pH<7).

#### **II.7.1.3. Densité relative**

La densité des HE.s des graines et de la partie fraîche de persil est de 0.974 et 1.173 respectivement ;(la densité de l'HE de persil frais est supérieure à celle de l'eau).

#### **II.7.1.4. Pouvoir rotatoire**

Contrairement à l'essence de persil extraite à partir des graines ; les HE.s de persil frais dévient la lumière polarisée. En effet, elles ont un pouvoir rotatoire positif.

#### **II.7.1.5. Miscibilité à l'éthanol**

L'huile essentielle des graines de *Petroselinum crispum* est plus miscible à l'éthanol que le persil frais.

### **II.7.2. Propriétés chimiques (Ouis, 2015)**

#### **II.7.2.1. Indice d'acide**

Les huiles essentielles de persil présentent un indice d'acide élevé entre 5.61 et 11.22 ; ceci concorde avec la faible valeur du pH de ces essences.

#### **II.7.2.2. Indice d'ester**

H.Es de persil possèdent un indice d'ester qui varie entre 13.04 pour les essences des graines de persil et de 54.78 pour les HE.s de persil frais.

### **II.8. Propriétés thérapeutiques de persil (*Petroselinum crispum*)**

#### **II.8.1. Activité anti-oxydante**

Ce sont les huiles essentielles (apiol et myristicine), les coumarines, les vitamines, les minéraux, les chlorophylles, les caroténoïdes et plusieurs classes de polyphénols, en particulier les flavonoïdes tels que les flavonols (kaempférol et quercétine) et les flavones glycosylées (apigénine et lutéoline) qui confèrent au persil une activité anti-oxydante et une capacité à éliminer les radicaux libres (Chauhan et Aishwarya , 2018 ; Dobričević et al ., 2019 ; Bahare et al ., 2019 ; Marín et al ., 2016 ; Papuc et al ., 2016) .Le persil est la plante la plus riche en caroténoïdes après le cresson et la carotte, .Les flavonoïdes et surtout quercétine et kaempférol s'opposent à la peroxydation des lipides et préviennent les dommages des radicaux libres (Agyare et al ., 2017) .

#### **II.8.2. Activité antidiabétique et hépato-protecteur**

L'action antidiabétique de *Petroselinum crispum* vient en partie du fait de son activité anti-oxydante et de son mécanisme d'action qui impliquait l'inhibition du la gluconéogenèse et la

stimulation de la glycolyse. Il s'est avéré que les terpénoïdes, les flavonoïdes et leurs dérivés glucosides, les coumarines et l'acide ascorbique possèdent une action antidiabétique. En effet, des tests *in vivo* ont montré que le persil a un effet hépato-protecteur et il est capable de normaliser le taux de glucose dans le sang et diminuer les taux des transaminase hépatiques et la peroxydation lipidique dans foie (Agyare et al ., 2017 ; Bolkent et al ., 2004 ; Ozsoy-Sacan et al ., 2006 ; Khaled et al ., 2019 ; Mahmood et al ., 2014 ).

### **II.8.3. Activité anticancéreuse**

Le persil protège les dommages de l'ADN dans les cellules normales et augmente l'expression de p53, p21/Cip1 et la cadherine-E, comme il inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses MCF-7 et Hep G2 par son action cytotoxique et anti-oxydante (Farshori et al ., 2014 ; Kuan-Hsun et al ., 2019 ; Tang et al ., 2015 ) .

Des molécules cytotoxiques naturelles a été identifiée dans le persil, comme le flavone (apigénine), les huiles essentielles (apiol et myristicine), qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Mahmood et al., 2014 ; Craft et Setzer , 2017)

### **II.8.4. Activité immuno-modulatrice**

*Petroselinum crispum* bloque la réponse immunitaire cellulaire et humorale en inhibant la prolifération des splénocytes mitogènes. Ainsi, le persil module de manière significative les activités des macrophages *in vitro*, par l'inhibition de l'oxyde nitrique (NO), confirmant ainsi son potentiel immuno-modulateurs, sans aucun effet cytotoxique. Le persil peut être utile pour la régulation des réponses immunitaires particulièrement pour l'inflammation, et aussi les infections bactériennes qui peuvent déclencher des allergies, des maladies auto-immune et le rejet de greffe (Yousofi et al ., 2012) .

### **II.8.5. Activité analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique**

Les propriétés analgésiques de persil (*Petroselinum crispum*) sont produites par l'inhibition de la synthèse ou de l'action des prostaglandines et des oxydes nitriques, inducteurs de l'inflammation. Il a une activité potentiellement puissante et efficace vis-à-vis des activités anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques semblables au paracétamol. (Al-khazraj, 2015 ; Yousofi et al., 2012) .

### **II.8.6. Action antiallergique**

L'action antiallergique et anti-inflammatoire de persil vient probablement de ses flavonoïdes : la lutéoline, l'apigénine, et la quercetine. En effet, des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que les flavonoïdes inhibaient la libération d'histamine par les mastocytes et l'expression des

gènes codant pour les cytokines inflammatoires. Elle atténue également les symptômes de l'asthme modulée par la présence d'IgE (Chandler, 2008).

### **II.8.7. Activité spasmolytique**

Le persil présente un effet de relaxation en diminuant les contractions spontanées de l'iléon par un blocage des canaux calciques voltage-dépendants (Chauhan et Aishwarya, 2018).

On pense que *Petroselinum crispum* a la capacité d'influencer le péristaltisme de l'intestin, indiquant une possible activité anti-motilité de l'intestin. Cependant, il semble que l'effet de relaxation a été induit par les flavonoïdes et des composants présents dans l'huile essentielle de persil, comme l' $\alpha$ -pinène, b-pinène (Govahi et al ., 2015 ; Damabi et al ., 2010 ).

### **II.8.8. Activité neuro-protecteur**

Le persil, très riches en antioxydants, prévient la neuro-toxicité induite par le cadmium(Cd), en réduisant les changements délétères associés au traitement au Cd sur le comportement, le niveau des neurotransmetteurs, le stress oxydatif et la morphologie des neurones (Allam et al ., 2016).

Il atténue l'oxydation cellulaire, prévenir la peroxydation des cellules nerveuses dans la maladie de parkinson, par son activité inhibitrice de l'ACE (Ziai et Moradganjeh , 2017 )

### **II.8.9. Activité néphro-protecteur**

Le persil prévient les maladies rénales grâce à ses actions diurétique (l'inhibition de l'activité de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase dans le cortex rénal et la moelle épinière), dépurative, antispasmodique et antioxydant, ainsi par l'inhibition de la cristallisation, la nucléation et le regroupement des cristaux .Ce sont la chlorophylle, le magnésium et les phyto-phénols qui lui confèrent cette activité. Associée à des traitements alternatifs ou complémentaires pour diverses maladies rénales, le persil à de meilleurs effets sur la lithiase urinaire (Nirumand et al., 2018) .

### **II.8.10. Activité anti –plaquettaire et effet hypotenseur**

De nombreuses maladies cardio-vasculaires, comme l'hypertension artérielle, sont associées à une augmentation de l'activité des plaquettes sanguines (Ouis ,2015).

La plante médicinale *Petroselinum crispum* a démontré un fort effet d'agrégation antiplaquettaire. Cette activité serait imputable aux aglycones ; le kaempférol, l'apigénine, lutéoline et la cosmosiine qui composent le persil. Ils agissent en tant que concurrents avec le récepteur du thromboxane A2 (TXA2), un inducteur d'agrégation plaquettaire (Guerrero et al ., 2007 ; Chauhan et Aishwarya ; 2018) .

En effet, un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ainsi que des essais cliniques suggèrent les effets bénéfiques des flavonoïdes sur la santé. En particulier, on croit qu'un apport élevé en

flavonols prévient l'apparition de maladies cardiovasculaires (Chandler, 2008). Cependant, c'est grâce à son activité diurétique que le persil à un effet hypotenseur.

#### **II.8.11. Activité antimicrobienne et cytotoxique**

*Petroselinum crispum* a un spectre antibactérien très large .En effet ,il agit sur différentes souches tel que *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* ( Farazaei , 2013 ;Khalil et al ., 2017 ) , *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pyogenes* ,*Staphylococcus epidermidis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Aljanaby, 2013 ; Ojala et al ., 2000 ) , *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* (Semeniuc et al ., 2016) .

Ce sont les psoralènes, 8-méthoxypsoralène, 5-méthoxypsoralène, l'oxypeucedanine et l'isopimpinelline parmi les furocoumarines qui lui confèrent cette activité (Farazaei, 2013).

#### **II.8.12. Activité antifongique et antimycosique**

Des études très récente ,confirme l'action du persil sur *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderme vert* (Linde et al ., 2016 ) et *Colletotrichum acutatum* (Pineda et al ., 2018 ) .

#### **II.8.13. Effet protecteur pour l'appareil digestif**

Le persil a des effets bénéfiques sur différents modèles d'ulcères gastroduodénaux par l'intermédiaire de ses activités anti-sécrétoire et cytoprotectrice exercées par les tannins, les flavonoïdes et les triterpènes (Al-Howiriny et al ., 2003) .

Son activité laxative est due par une absorption importante de sodium et d'eau, ainsi qu'une augmentation de l'activité du transporteur de Na-KCl<sub>2</sub> dans le côlon (Chauhan et Aishwarya, 2018).Cependant ses effets carminatif et anti-flatulence aide à stimuler la digestion (Christophe ,2019).

#### **II.8.14. Activité anti-ostéoporotique et œstrogénique**

Le persil exhibe une puissante activité œstrogénique. Cette action est liée aux flavone-glycosides ; 6"-acétylapiine ainsi que des aglycones flavonoïdes ; apigénine, diosmétine, et kaempférol. Les flavonoïdes également appelés phytoestrogènes, sous forme d'isoflavones se lient aux récepteurs d'œstrogènes et affectent les processus régulés par les œstrogènes. Ces phytoestrogènes préviennent la résorption osseuse et maintiennent ou améliorent l'ostéoporose par l'augmentation de la densité osseuse. En raison de leur activité œstrogénique, elles peuvent inhiber l'ostéoporose pour un certain degré chez les femmes ménopausées .Le persil contient également de la vitamine k qui, positivement affecte l'équilibre calcique, un minéral clé dans le métabolisme osseux ; la quercétine qui induit

l'apoptose des ostéoclastes matures et inhibe la résorption osseuse et la diosmétine induisent une différenciation ostéoblastique (Hozayen et al ., 2016) (tableau 9).

**Tableau 9:**Récapitulatif des propriétés thérapeutiques de persil (*Petroselinum crispum*) (Mahmood et al ., 2014 ; Craft et Setzer , 2017 ; Hozayen et al ., 2016 ; Chandler , 2008 ;Linde , 2016 ; Pineda , 2018 ; Nirumand et al ., 2018 ; Dobričević et al ., 2019 ; Farazaei et al ., 2013)

<b>Composants de persil</b>	<b>Activités biologiques</b>
-Composés phénoliques	-Activités anti oxydantes et antibactériennes
-L'acide ascorbique	-Prévient le risque d'insuffisance rénale
-Terpénoïdes, Flavonoïdes, Glucosides, Coumarines, l'acide ascorbique	-Propriétés antidiabétiques
-Flavonoïdes (apiine, lutéoline, apigénine-glycosides), coumarine, l'acide ascorbique, tocophérol, caroténoïdes, minéraux et les huiles essentielles (apiole, myristicine)	-Propriétés anti-oxydantes
-Apigénine et quercétine	-Restreint le poumon humain, le côlon, le sein, les cellules cancéreuses de la prostate, du cerveau et de la peau, la leucémie, les stades initiaux d'athérosclérose et maladies neuro -dégénératives
-L'huile essentielle et extraits de persil	-Supprimer les cellules et l'humus réponse immunitaire, allergie, auto-immune et les troubles inflammatoires chroniques, antifongique et antimycosique
-Kaempférol et quercétine	-Traitement de l'hyperuricémie
- Lutéoline, apigénine, et quercétine	-action anti-inflammatoire et antiallergique
-α tocophérol et Flavonoïdes	-Intercepter les fonctions plaquettaires, activation et agrégation, pathologies Cardiovasculaire
-Apigénine et cosmoisine	-Forte activité anti-agrégation plaquettaire

-Apiol, myristicine	-Anxiolytique, insecticide, anti-inflammatoire, chimio-préventive du cancer, hépato-protecteur, antipyrétique, diurétique, insecticide et anti-tumoral
-Apigénine	-Anti-oxydante, antimutagènes, anti-cancérigène, anti-inflammatoires
- Chlorophylle, magnésium et phytophénols	-Prévenir les maladies rénales
-Calcium, vitamines C, k , et ergostérol (précurseur de la vitamine D)	-Puissante activité Anti-ostéoporose
-Isoflavone , 6"-acétylapiine apigénine, diosmétine, quercétine, kaempférol et vitamine K.	-Activité œstrogénique
-Extrait éthanolique	-Spasmolytique ( <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ), Antimicrobien et cytotoxique ( <i>in vitro</i> ), neuroprotecteur ( <i>in vivo</i> ), Prévenir les ulcères gastro-duodénaux ( <i>in vivo</i> )

---

## **II.9. Apports de *Petroselinum crispum* dans la chélation**

Actuellement, de nombreux travaux de recherche approuvent l'utilisation prometteuse de persil dans des processus de détoxification. En effet, de nombreux chercheurs confirment que le persil est un puissant diurétique, dépuratif et antiseptique pour le sang, le système digestif et urinaire (Christophe, 2019); ce qui nous laisse à penser que *Petroselinum crispum* sera un excellent candidat pour la prévention contre la toxicité de cuivre.

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

#### **III.1. Matériel végétal**

Le persil a été récolté, en juillet 2016 dans la région de Saida (Algérie) surnommée la ville des eaux, à cause de ses sources. L'identification de cette espèce a été effectuée par le Professeur Fdo, Pedro sánchez gómez, laboratoire de recherche en botanique, Université de Murcie, Espagne ( fig.3).



**Figure 3 :** Persil utilisé pour l'identification

#### **III.2. Situation géographique de la région** (Date and time info, 2019)

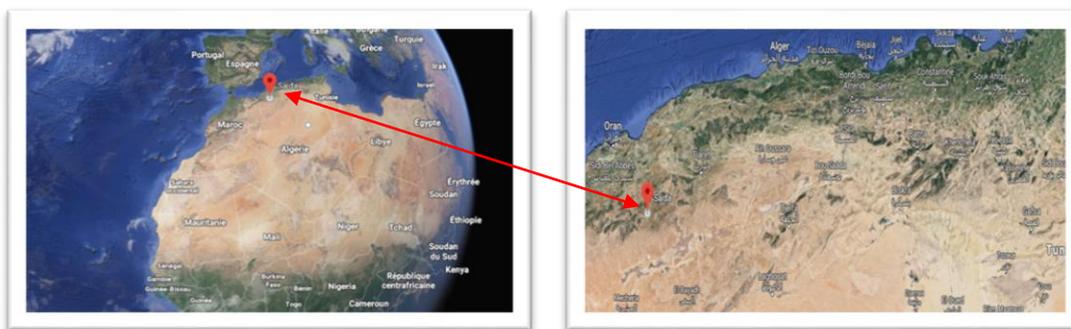
Superficie : 6765 km<sup>2</sup>

Localisation : Nord-ouest de l'Algérie

Altitude : 840 m

Latitude : 34°49'49" Nord

Longitude : 0°09'06" Est



**Figure 4 :** Carte de situation géographique de la wilaya de Saida (Google Maps/Google Earth Additional Terms of Service ,2019)

### **III.3. Etude de la structure sécrétrice des huiles essentielles**

Pour localiser les sites sécréteurs des essences aromatiques de la plante, des coupes histologiques microscopiques au niveau des feuilles et des tiges de la plante ont été réalisées.

#### **Mode opératoire**

La réalisation des coupes anatomiques fines a nécessité l'utilisation d'un microtome afin de visualiser les différentes structures cellulaires constituants des feuilles et des tiges fraîches de persil . Les coupes obtenues ont été soumises à la technique de la double coloration au Rouge congo – Vert de méthyl , selon le protocole emprunté à Deyson (1954).

#### **Observation au microscope**

Les observations des coupes réalisées au microscope photonique ont permis de visualiser les différents tissus et localiser avec précision les différentes structures sécrétrices à caractère endogène .

### **III.4. Extraction par hydrodistillation ( HD)**

L'extraction des huiles essentielles a été faite selon le protocole de Ouis (2015) ; qui consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les composés volatils et semi-volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée.

#### **Mode opératoire**

75g de matière végétale ont été introduit dans un ballon de 500 ml d'eau distillée. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 3 heures .Le distillat ainsi recueilli était introduit dans une ampoule à décantation afin de séparer l'eau de l'HE.s qui a formé un surnageant .L'essence récupérée était conservée jusqu'à l'analyse dans des flacons bien clos à l'abri de la lumière et à basse température à 4°C pour éviter toute dégradation de l'HE.s (fig. 5).



**Figure 5:** Dispositif utilisé pour l'hydrodistillation

**Tableau 10 :** Conditions opératoires de l'extraction des HE.s par HD

---

Quantités de graines ou parties aériennes broyées (g)	75
Quantités d'eau distillée	500
Température maximal (°C)	100
Temps d'hydro-distillation	2 à 3 h

---

- **Calcul de rendement**

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale sèche utilisée (AFNOR 2000).

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

$$R_{HE} (\%) = (M_{HE} / M_S) \times 100$$

Où :

**R** : Rendement en HE.s (% m/m)

**M<sub>HE</sub>**: Masse d'HE récupérée exprimé en (g)

**M<sub>s</sub>**: La quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en (g)

**-Détermination du taux d'humidité du matériel végétal** (Taleb-Toudert ,2015)

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais .

### **Principe**

Il s'agit de quantifier l'eau contenue dans le végétal en le mettant en contact d'un solvant ( le toluène) , le tout a été porté à l'ébullition .

### **Mode opératoire**

Le dispositif utilisé (fig .5) était formé d'un ballon en verre de 500 ml placé sur le chauffe ballon et relié par un tube de raccordement à un tube cylindrique gradué. le tube cylindrique était surmonté d'un réfrigérant. Dans le ballon , le persil frais a été mélangé à un volume de toluène (100 mL) .Sous l'effet du chauffage le solvant ainsi que l'eau dans le végétal s'évaporaient .Une fois dans le réfrigérateur , les vapeurs se condensaient en gouttelettes qui s'accumulaient dans le tube gradué (eau à la base , le solvant en haut). L'opération a duré jusqu'au moment où le niveau d'eau dans le tube gradué devenait stable et le solvant limpide .A la fin de l'opération , l'intensité de chauffage avait augmenté afin de récupérer toutes les gouttelettes d'eau déposées sur les parois du réfrigérant .Après refroidissement, le volume d'eau a été lu sur le tube gradué et le taux d'humidité a été calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{Th = ( V /M) \times 0 ,998 \times 100}$$

Où :

**Th** : Taux d'humidité

**V** : Le volume d'eau

**M** : Masse de matériel végétal

**0,998** : Densité de l'eau

Le rendement est calculé par la formule :

$$\mathbf{R\% = ( m_{HE}/m_{VS}) \times 100}$$

Où :

**R%** : Rendement en HE.s

**m<sub>HE</sub>** : masse d'huile essentielle

**m<sub>MVS</sub>** : masse de matiere végétale sèche

$M_{MVS} : M_{mvf}(1 - Th)$

**Th** : Taux d'humidité

**m<sub>MVF</sub>** : masse de matériel végétal frais

### **III.5. Détermination des indices physico-chimiques des HE .s extraites de *Petroselinum crispum* (Ouis, 2015)**

Les HE.s de persil sont caractérisées par leur propriétés physiques (densité, pouvoir rotatoire, pH, miscibilité dans l'alcool,.....) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, d'ester, de saponification) permettant d'évaluer la nature des composés organiques (acide ester, alcène, carbonyle, alcane) présent dans l'essence.

Une évaluation des propriétés physico-chimiques des HE.s de persil, selon la pharmacopée européenne et la commission française de normalisation, a été entamée.

#### **III.5.1. Propriétés physique**

##### **III.5.1.1 Détermination de pH**

Le pH ou « potentiel hydrogène » mesure l'activité chimique des ions hydrogènes  $H^+$  en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Cette méthode décrit l'acidité ionique du produit à analyser, son principe consiste à introduire l'électrode du pH mètre dans le produit après le réglage de la température d'étalonnage. La lecture se fait directement sur le pH-mètre. Ainsi, les HE.s extraites ont été caractérisées par leur pH.

##### **III.5.1.2. Densité relative à 20°C**

###### **Principe**

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

###### **Mode opératoire**

A l'aide d'une seringue ha-miltonienne d'une capacité de 1ml au lieu du pycnomètre. Le volume était prélevé est de 0.20 ml pour chaque huile, ainsi que pour l'eau.

Expression des résultats ; la densité relative était donnée par la formule suivante :

$$D_{20} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

Où :

**M<sub>2</sub>** : La masse en g de tube rempli d'huile essentielle.

**M<sub>0</sub>** : La masse en g de tube vide.

**M<sub>1</sub>** : La masse en g de tube rempli d'eau.

### **III.5.1.3. Miscibilité à l'éthanol**

#### **Principe**

La miscibilité à l'éthanol est déterminée par le volume (V) d'alcool nécessaire pour former avec 0.5ml d'huile essentielle (HE) un mélange homogène.

**Mode opératoire** : un volume V ml d'éthanol, par fraction de 0.5 ml, a été ajouté à l'aide d'une burette, à 0.5 ml d'HE. Après chaque ajout, le mélange est agité, quand la solution devient limpide, puis le volume d'éthanol additionné a été noté. L'éthanol absolu a été employé pour les essences.

### **III.5.1.4. Point de congélation**

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur de solidification lorsque cette huile essentielle à l'état liquide est refroidie. Les huiles essentielles étaient placées dans des tubes à essais à l'intérieur d'un congélateur accompagnées d'un thermomètre.

### **III.5.1.5. Pouvoir rotatoire**

**Principe** : Le pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^t$  est la propriété que présentent certaines substances chimiques de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée, ce qui signifie la présence d'un atome asymétrique. Le pouvoir rotatoire spécifique est exprimé par la loi de Biot :

$$[\alpha]_D^t = \alpha / L \times c$$

Où :

**$\alpha$**  : Valeur de l'angle de déviation de la lumière polarisée sur le polarimètre.

**L** : Longueur de la cellule exprimée en dm.

**c** : Concentration de la solution à examiner en g/ 100 ml.

#### **Mode opératoire**

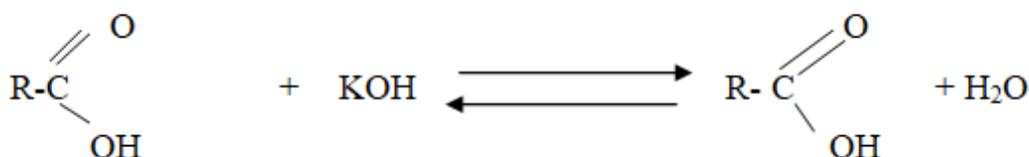
Afin d'évaluer les angles de rotation de nos essences, un polarimètre de marque : SERICO (size 56×21× 39 cm) a été utilisé, muni d'une cellule de 1 dm de longueur remplie d'une solution éthanolique d'HE à raison de 0.20g pour chaque échantillon dans 100 ml de solvant. L'angle de rotation observée est lu directement sur l'appareil permettant la détermination de la valeur du pouvoir rotatoire de nos essences.

### III.5.2. Propriétés chimiques

#### III.5.2.1. L'indice d'acide

**Principe :** L'indice d'acide exprime le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g d'huile essentielle.

L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivante :



#### Mode opératoire

Une quantité de 1g d'HE, 5 ml d'éthanol à 96 % et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphaléine) étaient mis dans un erlenmeyer .Ensuite, le mélange a été titré par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.1N jusqu'à ce que la solution vire au rose.

L'indice d'acide ( $I_a$ ) est déterminé par la formule suivante :

$$I_a = V \times C \times 56.11/m$$

Où :

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

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

**56,1 g** : La masse moléculaire relative de KOH

**C** : Concentration en mole. /L de la solution de KOH

#### III.5.2.2. Indice d'ester ( $I_e$ )

l'indice d'ester est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique des esters contenus dans 1g d'HE .



#### Mode opératoire

1g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5 M ont été introduite dans un ballon de 100 ml à l'aide d'une burette .L'ensemble est porté au reflux pendant 1h. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphaléine. L'excès de KOH est titré avec une solution d'acides chlorhydrique (HCL)

0.5 N jusqu'à la disparition de la couleur rose. Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

L'indice d'ester ( $I_e$ ) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = 28.05 / M \times (v_0 - v_1) - I_a$$

$V_0$  : Volume en Ml de la solution d'HCL (0.5N) mesuré pour l'essai blanc.

$V_1$  : Volume en Ml de la solution d'HCL (0.5N) mesuré pour le calcul de  $I_e$ .

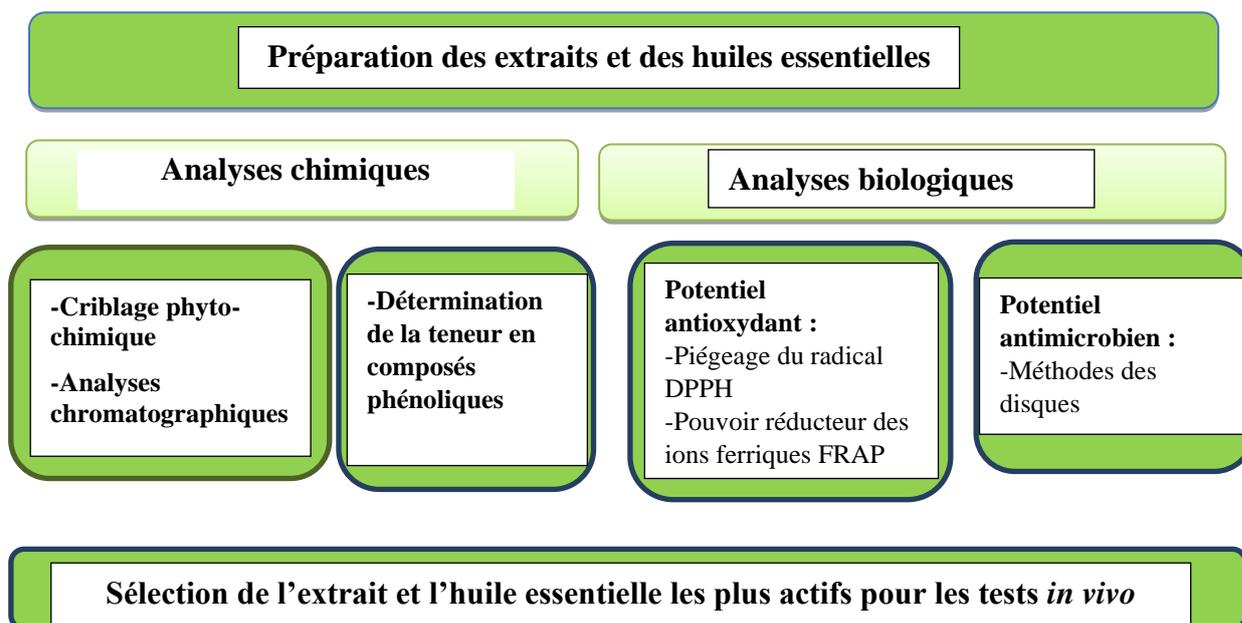
$M$  : Masse en g de la prise d'essai.

$I_a$  : Valeur d'indice d'acide.

➤ L'indice de saponification ( $I_s$ ) est déterminé à partir de  $I_e$  et  $I_a$

## II.6. Analyses phyto-chimique et biologique

L'objectif de cette étude consiste à identifier le maximum de composés afin d'élargir et approfondir la connaissance phyto-chimique de cette plante qui peuvent avoir un intérêt thérapeutique. Pour cela, des études phyto-chimique et biologiques ont été réalisées, en utilisant différentes méthodologies développées précédemment et qui sont décrites dans la figure suivante :



**Figure 6 :** Méthodologie adoptée pour l'étude phytochimique et biologique des extraits brut et les huiles essentielles de *Petroselinum crispum*

### III.6.1. Analyses phytochimiques

#### III.6.1.1. Criblage phyto-chimique

L'analyse phyto-chimique de *Petroselinum crispum* a été réalisée par les différentes méthodologies basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation, qui sont résumées dans le tableau suivant, en indiquant les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés :

**Tableau 11 :** Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phyto-chimique (Békro et al. , 2007 ; Karumi et al ., 2004 ; Badiaga, 2012 ;Oloyede ,2005 ;Majob et al ., 2003 )

Groupes chimiques	Réactifs	Résultats positifs
Alcaloïdes	Mayer, Wagner	précipité blanc jaunâtre ou brun
Flavonoïdes	HCl+ tournures de magnésium	une coloration rouge ou Jaune
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	coloration bleu foncé, verte ou noir
Stéroïdes et Terpènes	anhydride acétique + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Liebermann-Burchardt)	coloration violette –bleue ou verte
Quinone libres	HCL+CHCl <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> OH	coloration rouge violacée
Anthraquinones	KOH aqueux	un virage de la phase aqueuse au rouge
Saponosides	Test de mousse	
Amidon	NaOH + Réactif d'amidon	coloration bleue-violacé
Composés réducteurs	Réactif de Fehling	précipité rouge brique
Composés cyanogénétiques	CHCl <sub>3</sub> + une bandelette de papier filtre imprégnée de picrate de sodium	un virage au rouge de la bandelette
Coumarine	NaOH + l'eau distillée +HCl	la formation d'un précipité
Anthocyanes	HCl 2N + ammoniac	une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé

La présence des principales classes phyto-chimiques est classée comme suit :

- (+++): Test fortement positif
- (++): Test moyennement positif
- (+): faiblement positive
- (-): test négatif

#### - **Préparation des extraits de *Petroselinum crispum***

Une partie de la plante récoltée à été séchée à l'air libre et à l'ombre pendant 10 jours. Les échantillons étaient brassés chaque jour, puis broyés avec un broyeur (de marque *Hight star*). Les poudres ainsi récupérées étaient conservées au congélateur jusqu'à l'analyse à une température de -18 °C, dans des flacons en verre, sur lesquels le nom et la partie de l'espèce sont mentionnés.

Les extractions solide /liquide de la plante ont été réalisées dans un milieu hydro alcoolique et aqueux pour se rapprocher des préparations traditionnelles en impliquant trois modes de préparations : par macération, infusion et décoction pendant 1h respectivement.

#### - **Utilisation de *Petroselinum crispum* en médecine traditionnelle**

Les informations de terrain recueillies auprès des populations de la wilaya de Saida et l'usage empirique des différentes préparations traditionnelles ont retenu notre attention pour la sélection des méthodes étudiées. La préparation des remèdes est différente selon les principes actifs ciblés, et d'après une étude ethnobotanique récente (Moulay et Harig ,2016), la macération, l'infusion et la décoction constituent les principaux modes de préparation des plantes végétales dans la thérapeutique traditionnelle dans la wilaya de Saida.

#### - **Macération (Mac)**

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation pour en extraire les principes actifs. L'opération bien que généralement longue et a rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles (Aref et Heded ,2015).

#### **Mode opératoire**

L'extraction a été faite selon le protocole de Edrees (2015), qui consiste à macérer le matériel végétal avec un mélange éthanol-eau (70/30) dans les proportions persil brute /solvant = 1/10 : p/v, sous agitation (avec un agitateur thermique de type Gerhardt Bonn /MAG –H), à température ambiante, pendant 72 heures.

- **Décoction (Déc)**

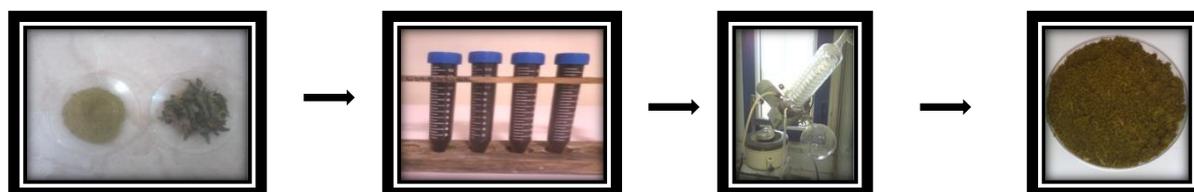
Le décocté de persil a été préparé en ajoutant environ 80 g de matériel végétal dans 800 ml d'eau dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant. Le tout a été porté à ébullition stable pendant 1h à l'aide d'un chauffe ballon.

- **Infusion (Inf)**

L'infusé de *Petroselinum crispum* a été obtenu en versant 100ml d'eau bouillante sur 10 g du matériel végétal sous agitation puis le mélange a été refroidi à température ambiante pendant 15 min.

Les suspensions obtenues après différentes méthodes d'extraction étaient ensuite filtrées sur papiers Whatman N°1.

Le filtrat hydro-alcoolique obtenu par macération représentait l'extrait hydro-éthanolique de feuilles de persil (EEP). Ce filtrat a été soumis à une évaporation à sec sous pression réduite à l'aide d'un rota vapeur (de type BÜCH / laboraratorium Technik AG /CH 9230-Flawl / SCH 6 VELZ , 4000 à 60 °C). Il a été choisi pour les différents tests chimique et biologique (fig.7).



**Figure 7 :** Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de persil EEP

- **Calcul du rendement de l'extrait hydro-éthanolique** (Aref et Heded ,2015)

Le rendement en pourcentage de la plante en extrait sec a été calculé par la formule :

$$R(\%) = (M / M_0) \times 100$$

**R(%) :** rendement en pourcentage

**M :** masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub> :** masse en gramme du matériel végétal de départ

### **III.6.1.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)**

#### **III.6.1.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux**

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits ont été déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage et exprimées en mg équivalent par g de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances résidait dans le fait que la majorité des propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes des plantes leur ont été attribuées.

##### **- Dosage des phénols totaux**

###### **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon les méthodes décrites par Singleton et *al.*(1999) ;Djelti et Belkhedim (2016), dont le principe repose sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (spectre d'absorption maximale à 760 nm) lors de l'oxydation des phénols. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de phénols ayant réagi.

##### **- Dosage des phénols totaux de l'extrait de persil**

###### **Mode opératoire**

Un volume de 0.5 ml de chaque extrait de persil a été additionné de 5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu. Après 3 min, un volume de 0,5 ml du carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 10% (P/V) y a été ajouté, avant de laisser incuber une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance a été lue contre un blanc (eau distillée à la place de l'échantillon dans un même volume réactionnel) à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux de type Semie –Auto Chemistry /Analyzer BA -88. Une droite d'étalonnage a été établie avec plusieurs concentrations d'acide gallique (0,0078, 0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 et 2 mg / ml) et la quantité de poly phénols a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique/g de persil (EAG/g). Cette méthode de dosage a été effectuée selon le protocole de (Singleton et *al.*, 1999).

La concentration en phénols totaux était exprimée en moyenne ± écart-type en mg d'acide gallique par g de persil brut sur trois expériences indépendantes.

## - Dosage des phénols totaux de l'huile essentielle de persil

### Mode opératoire

Une prise de 10 µl d'HE de persil convenablement diluée a été mise dans un tube en présence de 95 µl d'eau distillée ; 20 µl Twin 80 et de 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 6 mn, 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7 % ont été ajoutés et le mélange a été ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Le tube a été mis au repos pendant 90 mn à température ambiante et à l'obscurité, ensuite l'absorbance a été mesurée à 760 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoire en utilisant l'acide gallique à différents concentrations (0,0078, 0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 et 2 mg / ml). Cette méthode de dosage a été effectuée selon le protocole de (Djelti et Belkhedim ,2016).

La concentration en phénols totaux a été exprimée en moyenne ± écart-type en mg d'acide gallique par g d'huile essentielle de *Petroselinum crispum* sur trois expériences indépendantes.

### III.6.1.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

#### Principe

La teneur en flavonoïdes des différents extraits de persil a été déterminée selon la méthode décrite par Woisky et Salatino (1998) qui utilisait le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) comme réactif. La présence d'une case libre dans l'AlCl<sub>3</sub> forme une liaison avec les doublets libres de l'oxygène des groupements OH des flavonoïdes, en produisant un complexe de couleur jaune, dont le maximum d'absorption se situe à 430 nm.

Les quantités des flavonoïdes de l'extrait, ont été obtenues par extrapolation sur une droite d'étalonnage établie avec plusieurs concentrations connues de quercétine.

## - Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait hydro-éthanolique

### Mode opératoire

La procédure consistait à mélanger 1 ml de l'extrait de persil avec 1 ml de solution d'AlCl<sub>3</sub> à 2% (P/V) et laisser réagir pendant 30 mn avant de lire l'absorbance contre un blanc à 430 nm. La concentration en flavonoïdes contenus dans l'extrait de Persil a été obtenue par extrapolation sur la droite d'étalonnage établie dans les mêmes conditions réactionnelles que l'échantillon avec de l'eau distillée à la place de l'extrait de persil. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par g de persil brut.

### **III.6.1.3. Identification chimique de persil par chromatographie sur couche mince (CCM)**

#### **Principe**

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son Rf (Rate factor ou rapport frontal), qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1 (Zitouni, 2017). Ainsi un Rf faible est caractéristique d'une molécule qui a peu migré et qui est donc proche de la ligne de dépôt, alors qu'un Rf élevé est caractéristique d'une molécule qui a fortement migré et qui est donc proche du front de migration, avec une forte affinité pour la phase mobile.

#### **Distance parcourue par le constituant**

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même Rf) ou à celle de la littérature.

#### **Mode opératoire**

Une chromatographie ascendante a été réalisée sur plaque de gel de silice (Gerhardt Bonn) de 1 mm d'épaisseur avec un support en plastique (20 x 20 cm). Les cuves ont été saturées 24 heures avec, comme phase mobile, un mélange de Chloroforme : benzène (75:25, v/v). La hauteur de développement est de 15 cm. Un dépôt de 20 µl se faisait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Plusieurs dépôts successifs du même analyte pourraient être effectués en même endroit. Cette pratique permet de concentrer l'analyte. L'iode a été utilisé comme révélateur chimique.

### **III.6.1.4. Identification chimique de *Petroselinum crispum* par CPG / SM-IE**

#### **Mode opératoire**

L'identification des composés a été réalisée par couplage CPG/SM-IE au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimiques (laboratoire de catalyse et de synthèse en chimie organique LCSCO) à l'Université de Tlemcen. Les HE.s de persil ont été

analysées au moyen d'un GC /MS (BURKER SQ Instruments) équipé d'une colonne capillaire moyennement polaire BR -5 ms (30 x 0.25 mm ID ; phase stationnaire 5 % de diphényl et 95% de diméthylpolysiloxane ; épaisseur du film : 0,25 µm). L'élution a été réalisée à un débit du gaz vecteur (He) :0,8 ml/ min en mode Split (1/100) à une température de 250°C.

La température du four a été programmée comme suit : 50 °C (15min) =>250C (2 °C par min) =>250 °C (10min). (fig.8)

- **Mode impact électronique CPG/MS-IE**

Acquisition Start après l'élution du solvant : **3 min**

Nombre de scan par seconde : **300**

Gamme de Masse est déterminée : **10-600**

La masse de chaque composé est comparés par une bibliothèque connue **NIST 11 (National Institute of Standards and Technology)**.



**Figure 8** : Le dispositif de GC/SM

### **III.6.1.5. Identification chimique de *Petroselinum crispum* par LC/MS** (Boufadi et al. 2014)

L'analyse chromatographique de l'extrait de persil a été réalisée par couplage LC-MS à l'Université Libre de Bruxelles (Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy), Brussels, Belgium.

#### **Mode opératoire**

La séparation a été effectuée sur une colonne symétrique préparative C18 (7 µm, 19 × 150 mm) ; par un système de chromatographie préparative (LC, Waters, Milford, MA, USA). En

utilisant la phase mobile : l'acide formique (2% dans l'eau) / méthanol. L'élution a été réalisée à un débit de 5 ml / min. Les séparations ont été réalisées en 90 min avec un gradient d'élution comme suit (% de méthanol, temps) : 5%, 0 min ; 95%, 70 min ; et 30%, 90 min.

Les spectres de masse ont été obtenus avec un QTOF6520 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) en utilisant une colonne Zorbax Eclipse XDB C18 résolution rapide HT 4,6 × 50 mm, 1,8 µm, en mode ESI-positif, avec un débit de 0,4 ml / min. En utilisant des phases mobiles composées de : (solution A) l'acétate d'ammonium 10 mM et (solution B) CH<sub>3</sub>OH dans un gradient d'élution comme suit (B%, temps): (10%, 0 min), (95%, 10 min), (10%, 15 min), (VCAP 3500 eV; Source T °, 350 ° C; fragmenteur, 110 V; skimmer, 65 V) .

L'échantillon a été préparé selon le protocole de Boufadi et *al.* (2014), en diluant EEP dans 200 ml d'eau et extrait avec 200 ml de chloroforme. La couche organique a été éliminée et la phase aqueuse était extraite avec 200 ml d'acétate d'éthyle (EtOAc) à trois reprises. La phase organique de l'EtOAc a été recueillie après évaporation complète du solvant acétate d'éthyle notée EAP. Les essais sur l'extrait sec ont été effectués après dissolution dans l'eau milli-Q.

### **III.6.2. Evaluation *in vitro* des activités biologiques**

#### **III.6.2.1. Potentiel antioxydant de nos extraits de *Petroselinum crispum***

Pour évaluer l'activité anti-oxydante *in vitro* de nos extraits naturels, différentes méthodes ont été développées (tableau 12). Ces méthodes impliquaient le mélange des antioxydants présents dans nos échantillons avec des espèces oxydants tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydées. Les antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfère d'électron (Beddou, 2015). Le pouvoir antioxydant de l'extrait hydro-alcoolique de feuilles et l'HE de persil testé a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel très puissant (acide ascorbique).

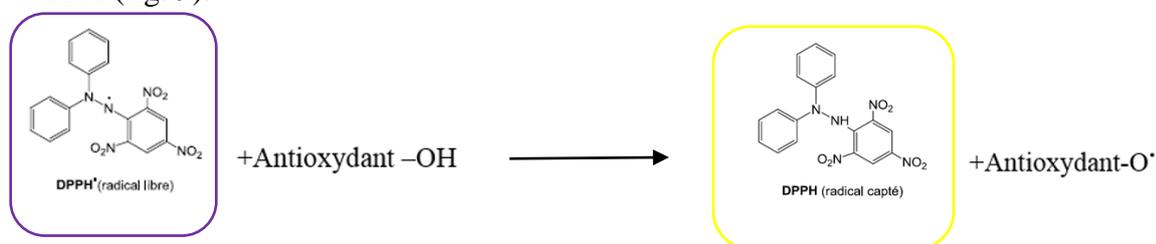
**Tableau 12 :** Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro* (Huang et al ., 2005 ;Karadag et al .,2009)

Classes de méthodes	Equation du mécanisme spécifique	Exemple
<b>Transfert d'atome d'hydrogène</b>	$AH + X \cdot \longrightarrow XH + A \cdot$ AH : antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène) X · : radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène) XH: radical libre inhibé A · : antioxydant stable	-Piégeage du radical DPPH·
<b>Transfert d'électron</b>	$M(III) + AH \longrightarrow M(II) + AH \cdot$ M(III) : antioxydant (donneur d'un électron) AH : radical libre (accepteur d'un électron) AH· : radical libre inhibé M(II) : antioxydant stable	-Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (test FRAP) ; -Analyse des phénols totaux (test au Folin –ciocalteu)  -Piégeage du radical DPPH·

**- Test de piégeage du radical libre DPPH**

**Principe**

Le potentiel anti radicalaire de nos extraits peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le radical : 1,1 - diphényl - 2 - picrylhydrazyle appelé DPPH. Selon Haddouchi et al. (2016), à température ambiante et en solution, le radical DPPH· présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette et l'apparition d'une couleur jaune pâle. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde (fig. 9).



*Ou Antioxydant - OH est un composé antioxydant capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH*

**Figure 9 :** Réaction entre le radical DPPH et l'antioxydant pour former le DPPH stable (Haddouchi et al., 2016)

## **Mode opératoire**

Le protocole expérimental suivi est celui de Haddouchi et *al.* (2016) avec quelques modifications. À différentes concentrations, 200 µl de chaque extrait pour (l'HE et l'extrait de persil) étaient ajoutées à 1800 µl d'une solution méthanoïque de DPPH à  $6,34 \times 10^{-5}$  M (0,0014 g dans 100 ml méthanol). Le contrôle négatif était préparé, en parallèle, en mélangeant 200 µl de méthanol avec 1800 µl de la solution méthanoïque de DPPH. Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance était mesurée à 517 nm.

## **Détermination du pourcentage d'inhibition**

D'après Khoudali et *al.* (2014), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (PI%) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI \%} = [(A_{\text{(blanc)}} - A_{\text{(échantillon)}}) / A_{\text{(blanc)}}] \times 100$$

**PI %:** Pourcentage d'inhibition.

**A (blanc) :** Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

**A (échantillon) :** Absorbance du composé d'essai

Le pourcentage d'inhibition était exprimé ensuite par la valeur de la  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice à 50%), sachant que la  $CI_{50}$  est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. Une faible valeur de  $CI_{50}$  correspondant à une grande efficacité des extraits (Ouis, 2015).

### **- Test de réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)**

## **Principe**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti radicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (Attou, 2011).

Selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu ; et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé (Zovko Končić et *al.*, 2010).

## **Mode opératoire**

La méthode FRAP est réalisée selon le protocole de Beddou (2015), qui consiste à mélanger 1ml de l'extrait à différentes concentration avec 1 ml d'eau distillée, 2.5 ml de tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium à 1 %. Le mélange a été incubé à 50° C pendant 20 min. Après incubation, 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10 % a été ajouté pour stopper la réaction. Ensuite, les solutions ont été centrifugées à 3000 tours/minute pendant 10 min, en utilisant une centrifugeuse (de marque DCA -300 RVT). Un volume de 2.5 ml du surnageant était ajouté à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de la solution de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) à 0.1 %. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre ; marque : BA-88). L'activité de l'extrait et l'HE était comparée à celle d'un antioxydant synthétique ; l'acide ascorbique.

### **III.6.2.2. Evaluation du potentiel antimicrobien**

#### **- Provenance des germes utilisés**

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur huit souches pathogènes (tableau 13). Ces souches ont été fournies par le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ; Département de Biologie ; Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers ; Université de Tlemcen.

#### **Tableau 13 : Description et pouvoir pathogène des souches testées**

ATCC : American Type Culture Collection .IP : Institut Pasteur.

Groupes de germes	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Infection hospitalières les plus fréquentées
Bacille Gram-	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	-les milieux aquatiques pollués - Aliments -Les excréments d'animaux	-Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes -Toxi-infections alimentaires ou salmonelloses
Bacille Gram-	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	-Fréquemment isolé en milieu hospitalier.	- Infections urinaires -Pneumonies -Arthrites -Troubles abdominaux et/ou cérébraux. -Septicémies
Cocci Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-Peau, cheveux -Nasopharynx -Périnée -Poussières, air -Aliments contaminés	-Infections cutanées, plaies, brûlures, abcès -Osrérites , Ostéomyélites -Endocardites -Septicémies -Infections pulmonaires -Intoxications alimentaires
Bacille Gram -	<i>Klebsiella pneumonie</i>	ATCC 70603	-Matières fécales -Voies aériennes supérieures -Aliment contaminés	-Infection pulmonaires et urinaires -Plaies -Septicémies
Bacille Gram -	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	-les selles -les eaux d'égouts -le sol - les produits laitiers	-Infections nosocomiales.
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	-Matières fécales -Aliments contaminées -Eaux usées	-Infections urinaires -Plaies -Septicémie -Infection respiratoire
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	-Tube digestif	-Septicémies et infections viscérales -Candidoses superficielles
	<i>Candida albicans</i>	(IP444)		

#### - Mise en culture des souches

Les tests antibactériens ont été réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches s'était effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu de culture liquide (bouillon nutritif). Après incubation de 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage a été réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 18 heures. A partir d'une pré-culture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C pour les bactéries, à 30 °C pendant 48 h pour les levures (Hellal , 2011) , quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis ensemencées dans du bouillon nutritif.

Selon la standardisation de Mc Farland, une densité optique (DO) comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de  $10^8$ UFC/ml ; la suspension d'inoculum a été diluée à  $1/100^{\text{ème}}$  dans le milieu de culture pour avoir une concentration de  $10^6$ UFC/ml (NCCLS, 2001). Un volume 15 ml de milieu LB (Lysogeny broth) semi solide a été mélangé avec 300µl du pré -culture étudiée dans des tubes bien stériles, puis le tube a été versé dans la boîte de pétrie.

#### - **Méthode de diffusion sur disque ou aromatogramme**

Cette méthode a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits .Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Beddou, 2015).

#### **Préparations des dilutions**

L'extrait et l'huile essentielle étudiés ont été dissoutes dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 600 mg /100 µl puis dilués par le bouillon LB (solution mère) jusqu'au volume de 3 ml. La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 2 % (200 mg/ml) (Fig. 10).

Pour effectuer ce test, des disques de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl d'extrait et d'huile essentielle solubilisé dans le DMSO étaient déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétrie. Le test a été effectué avec 4 types de concentrations (100, 50, 25 et 12.5 mg/ml). Les boîtes ont été laissées pendant une heure au réfrigérateur puis retournées et incubées à 37°C- 30°C pendant 24h -48h. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition était mesuré (mm), disque inclus (fig. 11).

La présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire claire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible (Cheurfa, 2017).

D'après Ponce et *al.* (2003) ; la sensibilité à l'essence a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

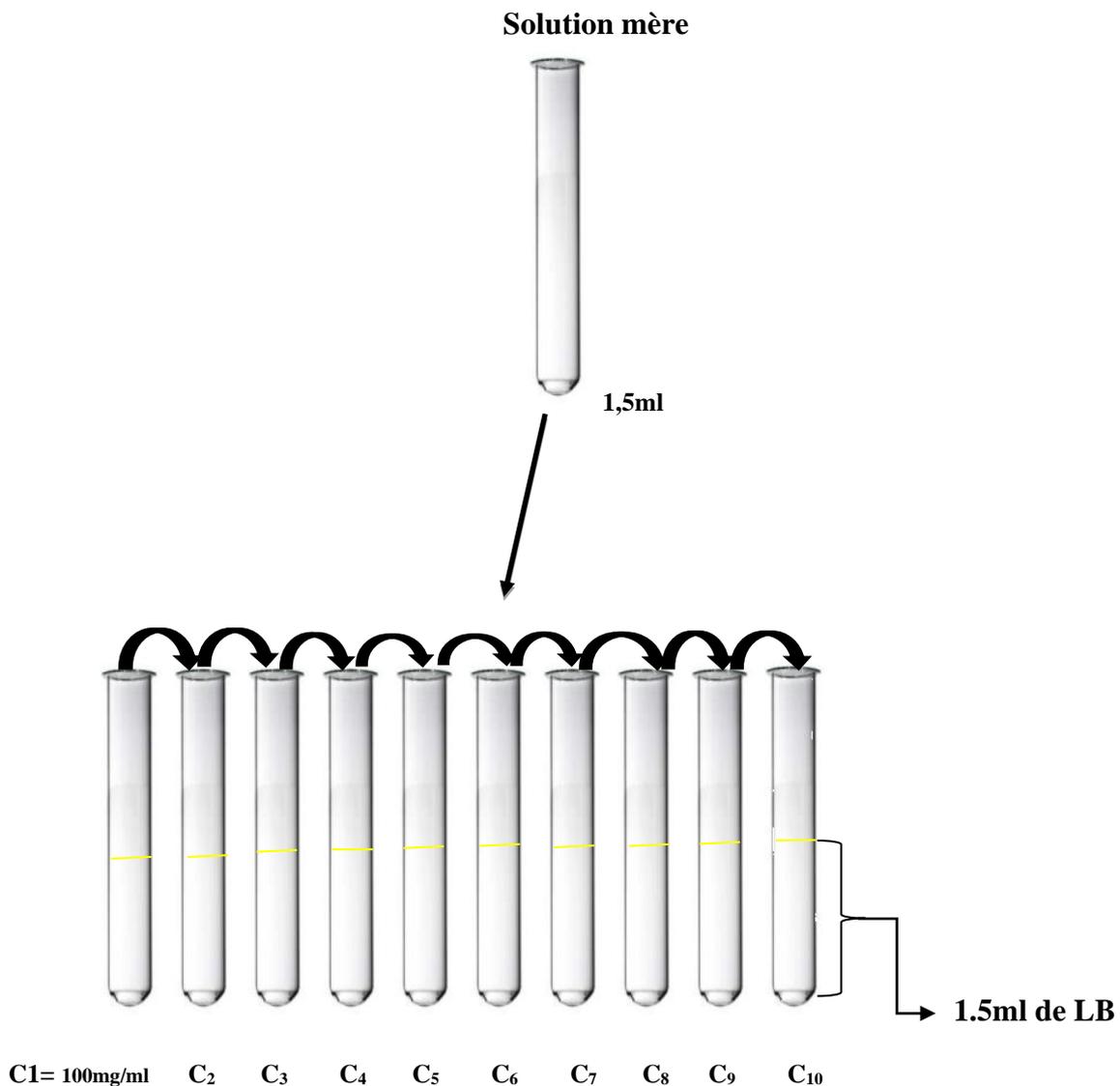
Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm

Sensible (+) pour des diamètres de 9 à 14 mm

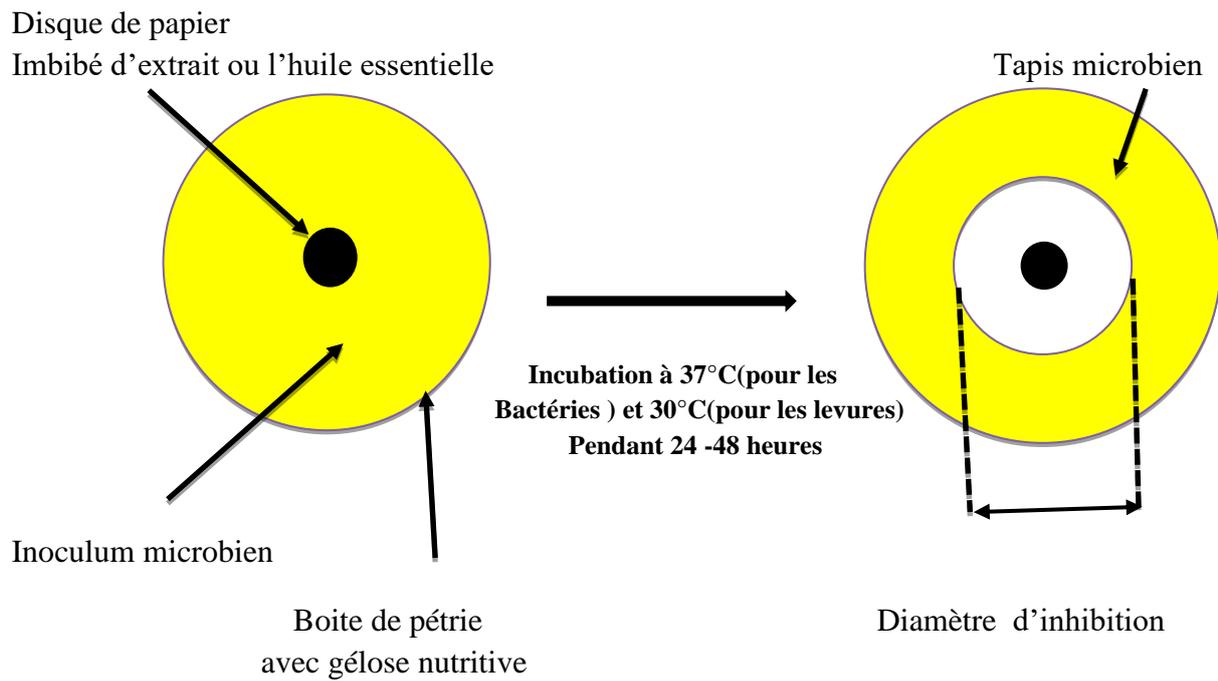
Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm

Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm

En parallèle, un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (10  $\mu$ l) a été utilisé.  
Dans les mêmes conditions que précédemment, un antibiotique de référence, la gentamicine (500  $\mu$ g/disque), choisie à cause de son spectre d'action assez large, a été utilisé en antibiogramme standard dont l'interprétation a été faite selon les recommandations du centre d'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CASFM / EUCAST, 2019).



**Figure 10 :** Préparation des dilutions successives de 1/2



**Figure 11 :** Principe de la méthode de diffusion sur disques

### III.6.3. Evaluation *in vivo* des activités biologiques

#### III.6.3.1. Produit chimique (Le sulfate de cuivre penta-hydraté)

Le sulfate de cuivre utilisé a été fourni par le laboratoire FAPROCHIM (Mascara, Algérie).

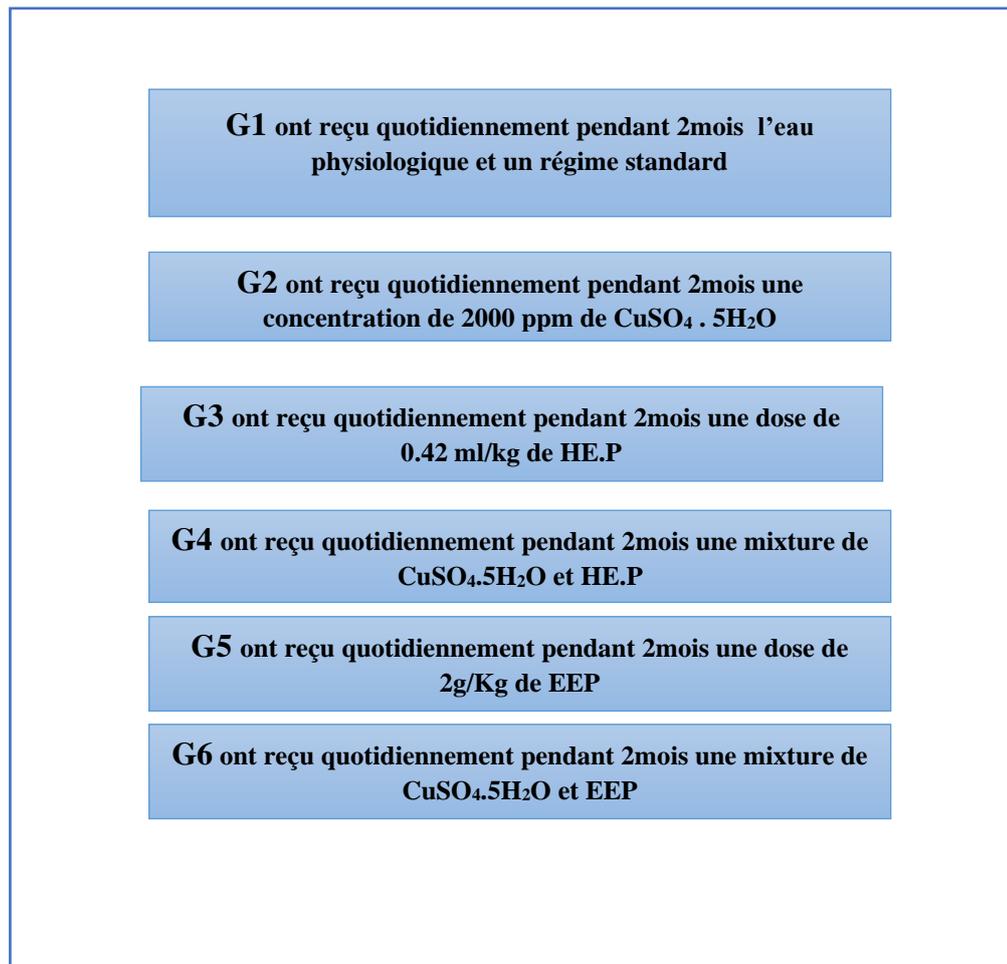


**Figure 12 :** Le sulfate de cuivre penta-hydraté

### **III.6.3.2. Répartition des groupes, prélèvements sanguins et d'organes**

Notre étude a été réalisée sur 42 rats wistar (males) pesant entre 105 et 121 g et fournis par l'Université de Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem, Algérie) .Ces rats ont été répartis en 6 groupes dans des cages en polyéthylène .Ils étaient nourris d'un aliment a base de croquettes provenant de la société de production des aliments pour animaux, (Saida, Alger) et à l'eau.

Les rats témoins (G1) ont été administrés quotidiennement, l'eau physiologique et un régime standard par voie orale, tandis que les animaux (G2) ont été exposés à une concentration de 2000 ppm de sulfate de cuivre par voie orale (Hebert et *al .*, 1993) , et ceux du groupe G 3 et G4 avaient été traité , respectivement, et par voie orale une dose de 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) (Abdellatif , 2015) et une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P). Les rats du G5-G6 ont été administrés, respectivement, et par voie orale une dose de 2g/Kg de EEP (Hozayen ,2015) et une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg d'extrait de persil (fig.13).



**Figure 13** : Protocole expérimental des rats

Après 2 mois de traitement, les rats ont été anesthésiés par du chloroforme et sacrifiés après un jeûne de 12h (fig. 14) . La collecte des échantillons de sang a été faite à partir de sinus orbital des rats, qui a été immédiatement recueilli dans deux tubes différents : sec et hépariné.

Après le sacrifice, les organes (foie, reins, rate et cerveau) ont été récupérés et fixés dans le formol pour l'étude histologique.



**Figure 14 :** Rats wistar dans les cages avant le sacrifice

### **III.6.3.3. Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques**

L'analyse des paramètres sériques a été effectuée en utilisant des analyseurs automatiques, biochimiques et hématologiques, respectivement, MINDRAY BS-240, MINDRAY BC – 2800.

### **III.6.3.4. Etude histologique**

L'étude histologique est basée sur une analyse sémiologique qui consiste à comparer les tissus normaux et les tissus pathologiques, dont l'objectif est de vérifier l'existence de modifications éventuelles dans l'architecture des organes (Chaa , 2019) , après l'administration de persil et de sulfate de cuivre penta-hydraté.

Cette étude a été réalisée sur différents organes (foie, rein, rate et cerveau) selon le protocole expérimental de Chaa, 2019 avec quelque modification.

### **Préparation des échantillons**

#### **-Fixation**

Le but de la fixation est de conserver les structures. En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements. Elle consiste à figer à un moment donné cellules, tissus, organes ou fragments d'organes dans un état aussi proche que possible à l'état vivant. Dans notre cas, les organes ont été fixés dans du formol à 10% (formaldéhyde à 10%).

#### **-Mise en cassette**

Chaque échantillon a été placé dans une cassette, en particulier pour le foie (vu son volume).

Les cassettes ont été plongées dans un récipient fermé de formol 10%, 10 fois le volume des prélèvements, pendant une durée d'au moins une heure.

#### **-Déshydratation**

On passe les tissus dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°). L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur.

#### **-Clarification**

Juste après la déshydratation, les cassettes ont été mises dans un bain de xylène à 40° C pendant 2 heures, cette opération a été répétée trois fois.

#### **-Inclusion**

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Or les tissus étaient mous, il faut donc leur donner une consistance solide. C'est le principe de l'inclusion. Le tissu a été placé dans de la paraffine fondue (portée à 56-58°C) dans la chambre thermique de la station d'enrobage ; la chaleur provoquait l'évaporation du solvant (et sa dissolution dans la paraffine), les espaces ainsi libérés étaient remplis par la paraffine. Puis la paraffine a été placée dans de petits moules dans la chambre de refroidissement, à basse température, ce qui a provoqué son durcissement et donc la rigidification des fragments tissulaires prélevés. Après le démoulage, des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine ont été obtenus.

#### **-Microtomie**

Des coupes ont été réalisées en utilisant un microtome (*Leica*, Allemagne), qui faisait avancer le bloc sur un rasoir, le bloc avançait d'environ 2 à 3 µm à chaque fois. L'ensemble des tranches ont formé un ruban dans lequel des coupes sériées de prélèvement tissulaire ont été retrouvées.

#### **- Etalement et collage des coupes sur des lames de verre**

Dans un bain – marie à 43%, les coupes avec la paraffine ont été chauffées dans une étuve et ainsi la paraffine colle à la lame.

#### **-Coloration des lames**

Un automate de type *Leica* 4040 a été utilisé pour le déparaffinage, la réhydratation et la coloration des lames. Le déparaffinage consistait à passer les lames dans des bains de xylène afin de dissoudre la paraffine. Une réhydratation a été réalisée, l'alcool se mélange avec l'eau et le xylène, puis les lames ont été passées dans des bains d'alcool de degré décroissant (100°, 95°, 90° et 70°).

La coloration des lames a été effectuée comme suit :

- Bleuir le noyau avec l'hématoxyline pendant 5 min ;
- Laver les lames avec de l'eau de robinet jusqu'au virage de la couleur au bleu-noir ;
- Les mettre dans l'acide chlorhydrique dilué pendant 1 min puis dans le carbonate de lithium 1 min ;
- Les tremper dans l'éosine 1% pendant 2 min ;
- Les mettre dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 96° pendant 5 min chacun pour alléger la sur-coloration ;

Mettre les lames dans du xylène à deux reprises pendant 5 min.

#### **-Montage des lames**

Les lames ont été montées pour préserver les colorations puis déshydratées grâce à des bains en toluène, puis ont été collées à des lamelles de verre par-dessus (grâce à des résines synthétiques) afin de préserver les préparations. Les lames préparées ont été laissées sécher puis observées sous microscope.

#### **Analyse statistique**

Les résultats des tests ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  écart-type et évalués par un test de Two-way ANOVA, avec le test Holm-Sidak's. Une probabilité  $p < 0,05$  est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec logiciel SigmaStat (version 3.5, USA) .

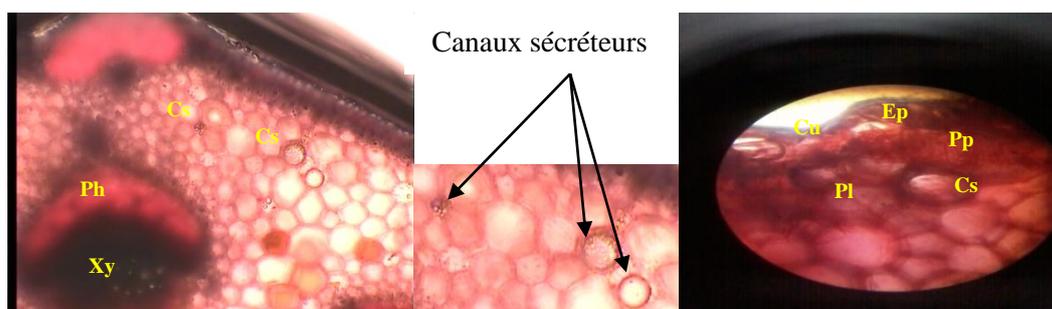
Les valeurs de  $CI_{50}$  ont été calculées à partir des équations linéaires, logarithmique ou projection directe sur les courbes (%inhibition=f concentrations). Les coefficients de corrélation entre les composés phénoliques et les méthodes de l'activité antioxydante ont été démontrés en utilisant EXCEL (2013).

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

### **IV.1. Etude de la structure sécrétrice des huiles essentielles**

Les observations des coupes réalisées au microscope optique , ont permis de visualiser les différents tissus et localiser avec précision les différentes structures sécrétrices à caractère endogène , ainsi la détermination de l'affiliation de cette échantillon à la famille des apiaceae. La totalité de l'appareil végétatif est parcourue de canaux sécréteurs contenant un mélange d'essence et de résines . Ces canaux sont très abondants au niveau des tiges par rapport au feuilles où l'on trouve un canal au niveau de chacune des cannelure .

Le canal sécréteur glandulaire lysigène de *Petroselinum crispum* apparait comme une poche de diamètre moyen . Ce canal glandulaire est de forme sphérique et bordé par une rangée de cellules secrétrices disposées de manière régulière . Ces dernières sécretent les essences qui sont versées dans le canal central (fig.15).



**Figure 15:** Observation en microscope optique des canaux sécréteurs de tige *Petroselinum crispum* (grossissement  $\times 40$ )

Faisceau criblovasculaire ( Ph :phloème , Xy :xylème) ; Cs :canal sécréteur ;Cu : cuticule ; Ep : épiderme ; Pp : parenchyme pallisadique ; Pl : parenchyme lacuneux .

### **IV.2. Extraction des huiles essentielles par la technique d'hydrodistillation**

#### **IV.2.1. Calcul du taux d'humidité de persil**

Les taux d'humidité ont été déterminés pour exprimer la valeur de rendement par rapport à la matière sèche .

**Tableau 14 :** Taux d'humidité de persil frais

	Masse utilisée	Taux d'humidité %
Persil frais	75	66 .53

#### IV.2.2. Calcul des rendements

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors des extractions par hydrodistillation durant trois heures ont été rapportés dans le tableau suivant :

**Tableau 15:** Rendements des HE.s obtenues par hydrodistillation

HE.s	Graines de persil	Persil*	Persil **
Rdt %	0.907-5.96	0 .14-2	3.31

\*Rendement en% d'HE obtenue à partir de la partie aérienne fraîche extraite (75 g)

\*\* Rendement en % d'HE obtenue à partir de la partie aérienne sèche extraite (75 g)

- Les rendements en huiles essentielles sont très variables.
- La plante (partie aérienne ou graines) séchée donne des rendements encore meilleurs par rapport à la plante fraîche.

Cette différence de rendement entre l'HE des graines et partie aérienne de persil est due à divers facteurs et principalement le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement, l'interaction avec l'environnement (la nature du sol, son PH ou climat), l'organe de la plante utilisé, la période de séchage, l'origine et l'âge de la plante, la méthode et le matériel employé pour l'extraction (Loziene et Venskutonis ,2005). Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en huiles essentielles.

### **IV.2.3. Influence du broyage des graines sur le rendement en huiles essentielles**

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau .16

**Tableau16 :** Comparaison du rendement en huiles essentielles à partir des graines sèches non broyées et celui obtenue à partir des graines sèches broyées

Graines de persil	Broyées	Non broyées
Masse(g)	75	75
Rendement(%)	2.1	0.907

D'après ces résultats, les fruits du persil broyés ont donnés un meilleur rendement en huiles essentielles que les fruits non broyés. Cela est dû à l'augmentation de la surface de contact eau-matière végétale lorsque les graines sont broyées, une meilleure filtration d'eau au sein de la poudre ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction par hydro-distillation.

Les rendements d' essence de persil puisée de la littérature sont données dans le tableau.17

**Tableau 17:** Rendements de l'HE puisées dans la littérature (Taleb-toudert ,2015).

HE	Rendement (%)
Persil	2 - 6

### **IV.3. Détermination des indices physico-chimiques des HE.s extraites**

#### **IV.3.1. Propriétés physiques**

##### **IV.3.1.1. Caractéristiques organoleptiques**

Les propriétés organoleptiques (l'aspect ,la couleur et l'odeur) des essences de persil sont regroupées dans le tableau .18

**Tableau 18:** Caractéristiques organoleptiques des essences étudiées

Caractéristiques organoleptiques	aspect	odeur	couleur
Graines de persil	liquide huileux	caractéristique du persil	jaune
<b>HE.s</b>			
Partie aérienne de persil	floconneux	caractéristique du persil	orange - marron

Les caractéristiques organoleptiques ( apparence , couleur ,odeur ,gout) étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle , mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences , il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises . La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques (Taleb-toudert ,2015).

Les résultats de la détermination des propriétés physiques des essences obtenues par hydrodistillation sont consignés dans le tableau. 19

**Tableau 19:** Caractéristiques physiques des HE.s extraites

Propriétés physique	PH	d <sup>20</sup> <sub>20</sub>	Miscibilité à l'éthanol	t°	[α] <sub>D</sub> <sup>T</sup>
<b>HE.S</b>					
-Graines de Persil	5.57	1.0017	1V/6.6V d'EtOH	-8°	-20
-Partie aérienne de Persil	5.56	0.86	1V/20Vd'EtOH	-8°	-25

D'après ces résultats:

- ❖ Les huiles essentielles de la partie aérienne et des graines de persil étaient acides (PH<7) .Il convient de souligner que le PH joue un rôle déterminant dans les réactions chimique et biochimique et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydant et antimicrobien) (Ouis, 2015).

- ❖ Contrairement à la partie aérienne, la densité de l'HE de graine de persil est supérieure à celle de l'eau.
- ❖ Les deux huiles essentielles contenaient des molécules lévogyre (-).
- ❖ L'HE des graines est plus soluble dans l'éthanol que celles de la partie aérienne de persil. Ces variations sont dues probablement à la densité (l'huile de graines de persil étant dense que la partie aérienne).

Les constantes physiques des essences de persil retrouvées dans la littérature (Ouis, 2015) ont été regroupés dans le tableau afin de les comparer avec ceux de nos résultats expérimentaux.

**Tableau 20:** Caractéristiques physiques des HE.s puisées dans la littérature (Didier, 2000 ; Caratini, 1983)

Propriétés Physiques	$d^{20}_{20}$	$[\alpha]^{D}_{20}$	Miscibilité à l'éthanol
HE.s de persil	0,974	-11° à -4°	5V

Les valeurs de la miscibilité et la densité à l'exception du pouvoir rotatoire et indice d'ester (un écart est observé), sont plus ou moins du même ordre de grandeur que ceux retrouvés dans la littérature (Didier, 2000 ; Caratini, 1983).

#### IV.3.2. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des H.Es de persil ont été regroupées dans le tableau. 21.

**Tableau 21:** Propriétés chimiques des essences étudiées

Propriétés chimiques	$I_a$	$I_e$	$I_s$
HE.s de graines de Persil	5.611	14.79	20.4
HE.s de la partie aérienne de persil	11.222	54.69	65.912

L'indice de saponification a été calculé à partir de la relation suivante :  $I_s = I_e + I_a$

#### **IV.3.2.1. Indice d'acide**

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans l'huile étudiée. Il peut aussi renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations notamment l'oxydation.

D'après les résultats obtenus, l'huile essentielle de la partie aérienne de persil a présenté un indice plus élevé par rapport à celui des graines. L'indice d'acide élevé enregistré concordait avec la faible valeur du PH de ces essences .

#### **IV.3.2.2. Indice d'ester**

L'indice ester de l'huile essentielle de la partie aérienne de persil est plus significatif par rapport à celui des graines .

#### **IV.3.2.3. Indice de saponification**

La faible valeur de l'indice de saponification des graines de persil indiquait que la masse moléculaire des acides gras de cette HE n'était pas élevée.

Les propriétés chimiques des essences de persil puisées de la littérature sont données dans le tableau.22 (Didier, 2000 ; Lazouni et al ., 2007) .

**Tableau 22** :Propriétés chimiques de persil puisées dans la littérature (Didier, 2000 ; Lazouni et al ., 2007).

Propriétés	I <sub>a</sub>	I <sub>e</sub>
Chimiques		
HE de persil	6	11

En comparant les résultats expérimentaux avec ceux de la littérature , les caractéristiques physico – chimiques variaient en fonction de la plante utilisée , l'organe de la plante (feuilles , tiges , fleurs ou graines ) , le stade reproducteur (avant ou après la floraison ) , le lieu de la culture , la méthode et les conditions d'extraction (Ouis , 2015) . Tous ces facteurs affectaient la composition chimique des HE .s .

### **IV.4. Analyses phyto-chimique et biologique**

#### **IV.4.1. Analyses phyto-chimiques**

##### **IV.4.1.1. Résultats des caractérisations phyto-chimiques**

Le screening phyto-chimique a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée. La détection de ces composés

chimiques a été basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité ou un changement de couleur spécifique.

Le tableau .23 illustre les résultats du screening phyto-chimique qui ont été classés en fonction des différents critères d'observation.

**Tableau 23 :** Résultats des tests phyto-chimiques des extraits de *Petroselinum crispum* obtenus par infusion, macération et décoction

Partie étudiée Familles Chimiques Recherchées	Feuille			Tige			Racine			Graine		
	Mac (EEP)	Déc	Inf	Mac	Déc	Inf	Mac	Déc	Inf	Mac	Déc	Inf
<b>Amidon</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Saponosides</b>	+	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-
<b>Tanins Cathéchiq</b>	+++	+++	++	++	+++	+	+	-	+	+++	+++	++ +
<b>Tanins Galliques</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Composés Réducteurs</b>	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	+	++
<b>Coumarines</b>	+++	-	-	+++	-	-	+++	+++	++ +	+	-	-
<b>Anthocyanes</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Stérols et tri terpènes</b>	+++	+++	++ +	+++	+++	++ +	+++	-	-	+++	+++	++ +
<b>Quinones</b>	+++	-	++ +	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alcaloïdes</b>	-			-			-			-		
<b>Flavonoïde</b>	+++			++			-			+++		
<b>Composés Cyanogénétiques</b>	-			-			-			-		

La nature des principes chimiques mises en évidence par le criblage phyto-chimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes de la plante étudiée .Il s'agit essentiellement de :

#### ❖ **Polyphénols**

Ces composés montraient des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar et *al.*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh et *al.*, 2008) et antioxydants (Gomez et *al.*, 2006).

#### ➤ **Tanins**

Composés phénoliques hydrosolubles. La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former un complexe avec les macromolécules, en particulier avec les protéines. Associés aux lectines, par exemple, ils sont capables de protéger l'organisme de l'infection bactérienne, fongique ou virale (N'guessan, 2011).

Par voie externe, les tanins imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

Par voie interne, ils exercent un effet anti diarrhéique et antifongique (Bruneton ,2009) ; ce qui pourrait justifier leurs effets thérapeutiques.

#### ➤ **Flavonoïdes**

Sont des antioxydants réputés par excellence. Ils ont la capacité de se lier à de nombreuses protéines du corps et de modifier les transporteurs, les enzymes, les hormones, l'ADN, la chélation des métaux lourds et de piéger les radicaux libres ; ils possèdent donc de fortes propriétés anti-oxydantes .Une myriade d'études pharmacologiques ont été rapportées suggérant leur utilité dans la prise en charge du diabète, des maladies cardiovasculaires, des troubles neurologiques, l'inflammation et des maladies microbiennes (Ayaz et *al.*, 2018) .

Outre leur pouvoir antioxydant, ils sont des antiulcéreux, anti-tumoraux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et anti-diarrhéiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, hypotenseurs et protègent du cancer et de la cataracte (Hadjaj, 2017).

Une panoplie d'études in vitro ont montré que les flavonoïdes pouvaient moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulaient la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (Bougandoura, 2011).

➤ **Coumarines**

Ont des propriétés antipyrétique, analgésique, sédative, spasmolytique, anti-œdémateuse et anti-convulsivante. Les plantes à coumarines, plus spécifiquement celles de la famille des Apiaceae, ont la capacité de favoriser l'expulsion des gaz intestinaux entraînant une diminution des ballonnements et des flatulences (Mpondo et *al.*, 2015). Les coumarines ont la capacité de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, super-oxydes et peroxydes (Caesar, 2007 ; Mpondo et *al.*, 2012).

➤ **Quinones**

Dérivant de l'antraquinone sont des laxatifs stimulants. Elles sont considérées comme des laxatifs stimulants. D'autres activités antidépressives, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites (Messaoudene et S bargoud ,2015).

❖ **Composés terpéniques**

➤ **Stérols et tri terpène**

Sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques (Daira et *al.*, 2016).

❖ **Hétérosides**

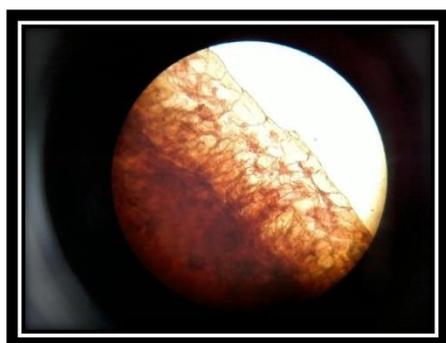
➤ **Saponosides**

Possèdent une grande variété d'activité biologiques telles que : antipyrétique, antalgique, immuno-modulatrice, anti-inflammatoire et anticoagulante (Lautrette, 2004).

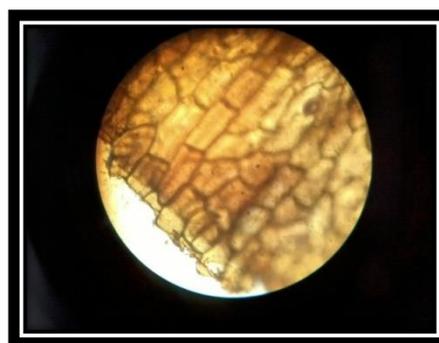
D'après les résultats obtenus, une dominance des composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines, quinones) a été constatée, suivie par les composés terpéniques (stérols et tri terpène), les composés réducteur et les hétérosides (saponosides) ; cependant les autres composants, leur présence dépend du solvant d'extraction.

Il est à noter aussi l'absence totale d'amidon (fig.16 et 17), alcaloïdes et composés cyanogénétiques dans tous les extraits des différentes parties de la plante.

L'absence d'amidon a été déterminée par l'observation des coupes histologiques au microscope optique.



**Figure 16 :** Observation en microscope optique de feuille de *P. crispum*  
grossissement  $\times 40$



**Figure 17:** Observation en microscope optique de tige de *P. crispum*  
grossissement  $\times 40$

Farzaei et *al.* (2013) ont pu identifier plusieurs composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (par exemple, apigénine, apiine et 6'' -acétylapiine), les huiles essentielles (principalement, myristicine et apiol) et aussi les coumarines qui sont les principes actifs trouvés dans *P.crispum*.

Une analyse faite par Al-howiriny et *al.* (2003) sur l'extrait alcoolique des feuilles de *P.crispum* rapporte la présence de tannins, flavonoïdes, stérols et/ ou tri terpènes. Une autre étude a été faite par Mahmood et *al.*(2014), les plus importants composés actifs identifiés sont les coumarines, l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les flavonoïdes, l'apiol, divers composés terpéniques, les phénylpropanoïdes, les phthalides et le tocophérol.

Les résultats de ce criblage permettaient d'élaborer des hypothèses pour expliquer l'activité biologique d'un extrait par la présence d'une famille chimique particulière.

#### **IV.4.1.2. Rendement en extrait sec de la plante**

L'extrait sélectionné (l'extrait hydro-alcoolique EEP obtenu par macération des feuilles de persil) a été conservé au réfrigérateur avant d'être analysés. Le rendement, l'aspect et la couleur de l'extrait brut hydro-alcoolique sont présentés dans le tableau.24

**Tableau 24** : Le rendement, l'aspect et la couleur de l'extrait brut hydro-alcoolique

	Rendement%	Aspect	Couleur
Extrait brut de <i>Petroselinum crispum</i> (EEP)	43 ,27%	Poudre	Vert marron

#### IV.4.1.3. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

##### IV.4.1.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait et l'huile essentielle a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montrait une linéarité et une proportionnalité de l'absorbance avec les concentrations des extraits.

Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque essence ont été rapportées en équivalent gramme d'acide gallique et déterminées par l'équation de type :  $y = 0,004x + 0,058$  sachant que  $R^2 = 0,995$  (fig. 18).

La teneur en polyphénols totaux de HE.P est  $32,49 \pm 4,16 \mu\text{g EAG/mg}$  d'huile essentielle, relativement faible par rapport à EEP  $949,60 \pm 19,065 \mu\text{g EAG/mg}$  extrait (fig.19).

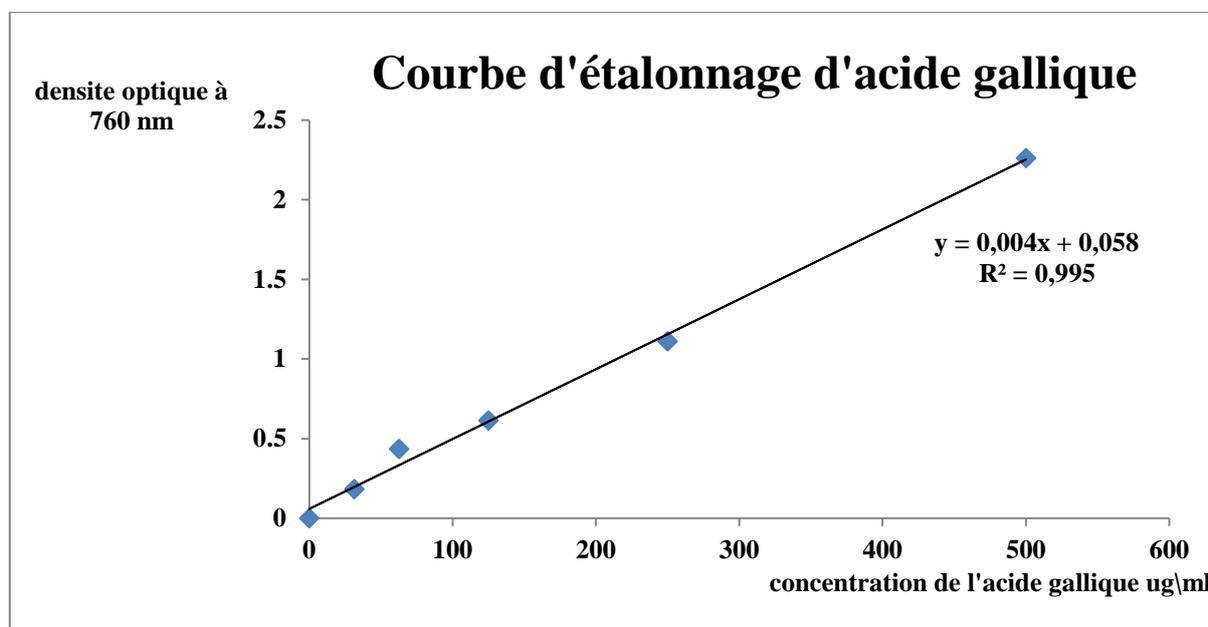
Cela est dû à la forte teneur en flavonoïdes, acides phénoliques, tanins, phénylpropanoïdes, coumarines et quinones dans l'extrait hydro-alcoolique analysé par LC-SM et les tests phytochimiques par rapport à l'huile essentielle.

Cette variation des teneurs peut être expliquée par l'origine de la plante, la méthode d'extraction (la polarité du solvant d'extraction) et les parties utilisées des plantes (Beddou, 2015). En effet, l'éthanol est considéré comme le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques très polaires suivi par l'éthyle acétate puis l'eau (Nedović, 2016).

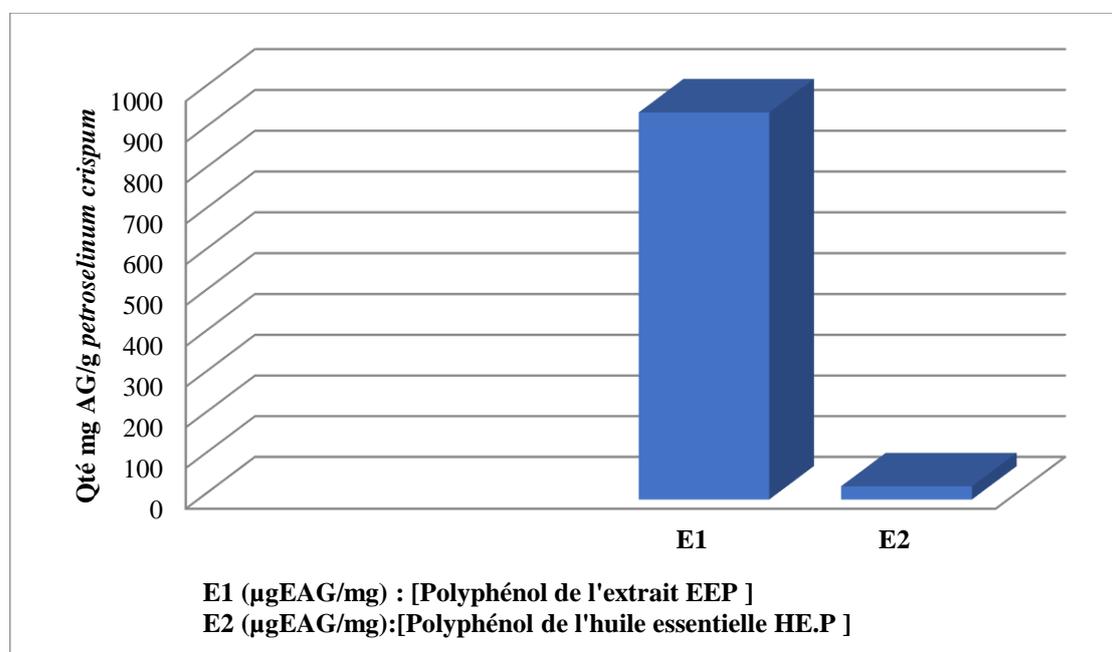
Elle dépend aussi d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (le climat, la période de récolte et les conditions du stockage) (Podsdek, 2007 ; Falleh et al., 2008).

Ce test, basé sur une réaction d'oxydoréduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité anti-oxydante. De ce fait, les extraits riches en composés phénoliques peuvent être également considérés comme les plus antioxydants (Beddou, 2015).

Plusieurs études ont suggéré que le persil présentait la plus grande teneur en polyphénols par rapport à d'autres plantes (par exemple : le fenouille et la lavande) (Irene, 2016 ; Viuda-Martos et al . , 2010 ) avec une concentration en polyphénols de 388.35 mg EAG Equivalents/L.



**Figure 18:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



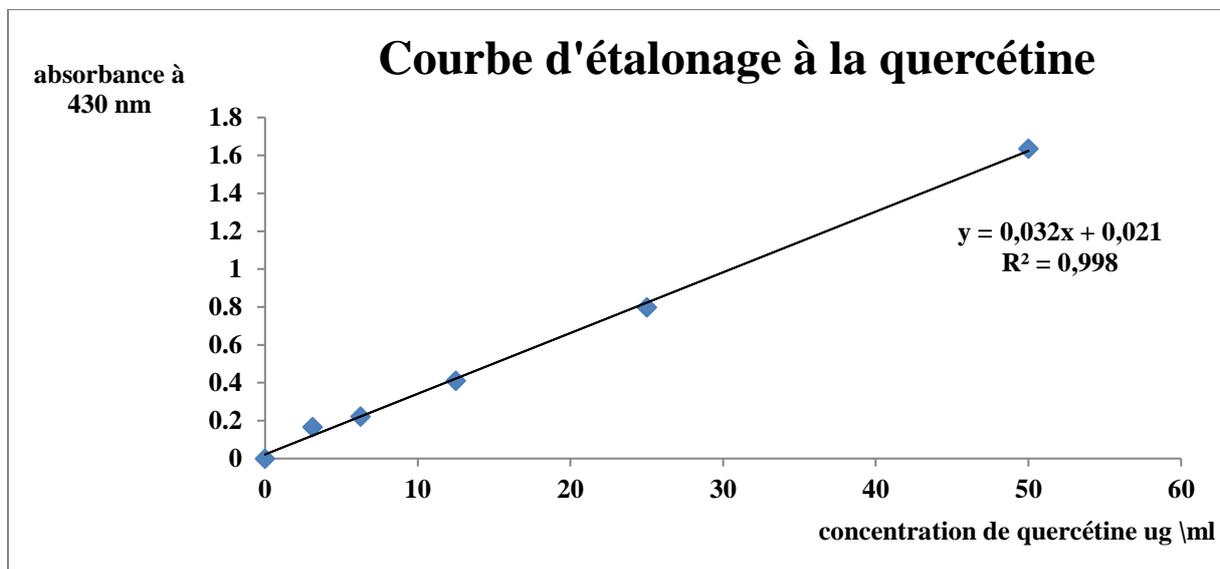
**Figure 19:** Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait EEP et l'huile essentielle étudiés

#### **IV.4.1.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et l'étalon été la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS).

Le taux des flavonoïdes de l'extrait hydro-alcoolique utilisé a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type :  $y = 0,032 x + 0,021$  sachant que  $R^2 = 0,998$ (fig. 20).

La concentration des flavonoïdes était relativement importante dans notre extrait  $935,56 \pm 21.065 \mu\text{g EQ} \setminus \text{mg}$  extrait.



**Figure 20:** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Selon abu-serie et *al.* (2019) l'extrait de persil renfermait des quantités considérables de polyphénols et flavonoïdes avec une teneur de  $99.84 \pm 28.11 \text{ mg eq/ g}$  extrait et  $30.86 \pm 0.89 \text{ mg eq/g}$  extrait respectivement.

#### **IV.4.1.3.3. Caractérisation phyto-chimique par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Dans notre étude, une chromatographie sur couche mince a été réalisée puisqu'elle est l'une des méthodes simples à mettre en œuvre et habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétal.

Les composants ont été isolés par CCM préparative (Fertigfolien /pre-coated sheets ; polygram ; sil G /UV<sub>254</sub>); (Fig.21 ) et leur pureté a été vérifiée par CPG /SM.



**Figure 21:** CCM analytique représentative des différentes huiles essentielles utilisées sur plaque de gel de silice développée dans le système solvant un mélange chloroforme : benzène (75:25, v/v)

Des HE.S de feuilles de persil achetées à la pharmacie ainsi que de fenouille renfermant, 37.873% et 0.164 % de terpènes respectivement ont été utilisés comme (Lamarati et al ., 1993).

Dans ce système de solvants, le nombre des taches atteignait cinq spots pour les feuilles de persil et sept pour les graines alors que dans l'HE de fenouille, six spots étaient présents. Concernant les HE.s de feuilles et de graines de persil achetées à la pharmacie, le nombre de taches était de cinq spots.

Les valeurs du rapport frontal (Rf) des essences de persil retrouvés dans la littérature (Lamarati et al ., 1993) ont été rassemblées dans le tableau n°25 afin de les comparer avec ceux de nos résultats expérimentaux .

**Tableau 25 :** Etude des arlypropènes extraits de l'huile essentielle de persil [*Petroselinum crispum* (Mill)] (Lamarati et al ., 1993)

**Système de solvants :** un mélange chloroforme : benzène (75:25, v/v)

RF	Composé
0.96	Monoterpène
0.81	Myristicine
0.70	Apiol
0.62	Dillapiole
0.55	Elémicine
0.41	Carvone
0.38	Allyl -tétraméthoxy -benzène
0.15	Furano -coumarine
0.12	Furano -coumarine

En comparant les Rf des spots des HE.s (tableau 26) avec ceux de la littérature (tableau 25), un certain nombre de composés a été identifié dans les HE.s des espèces étudiées. Dans toutes les huiles essentielles étudiées, un composé terpénique a été mis en évidence qui est le monoterpène.

D'après résultats de cette présente étude, des furano-coumarines ont été retrouvés dans les HE.s de graines de persil et de fenouille. Concernant l'huile de feuilles de persil, un allyl -tétraméthoxy -benzène a été mis en évidence.

Les huiles de graines de persil, obtenues dans cette étude, étaient très riches en composants par rapport à l'huile achetée à la pharmacie ; dont la présence de dillapiol a été remarquée.

Pour confirmer les résultats obtenus par CCM, une technique d'analyse plus efficace a été appliquée à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de persil ; la CPG qui reste la technique d'analyse la plus utilisée pour les huiles essentielles.

**Tableau 26 :** Résultats de la chromatographie sur couche mince des huiles essentielles :

Huile de feuilles de persil obtenue (A), HE de feuille de persil achetée (B), huile de graines de persil obtenue (C), HE de graines de persil acheté (D) et de fenouille (E).

Les dépôts de 5 mm de diamètre correspondent à 20 µl d'extrait

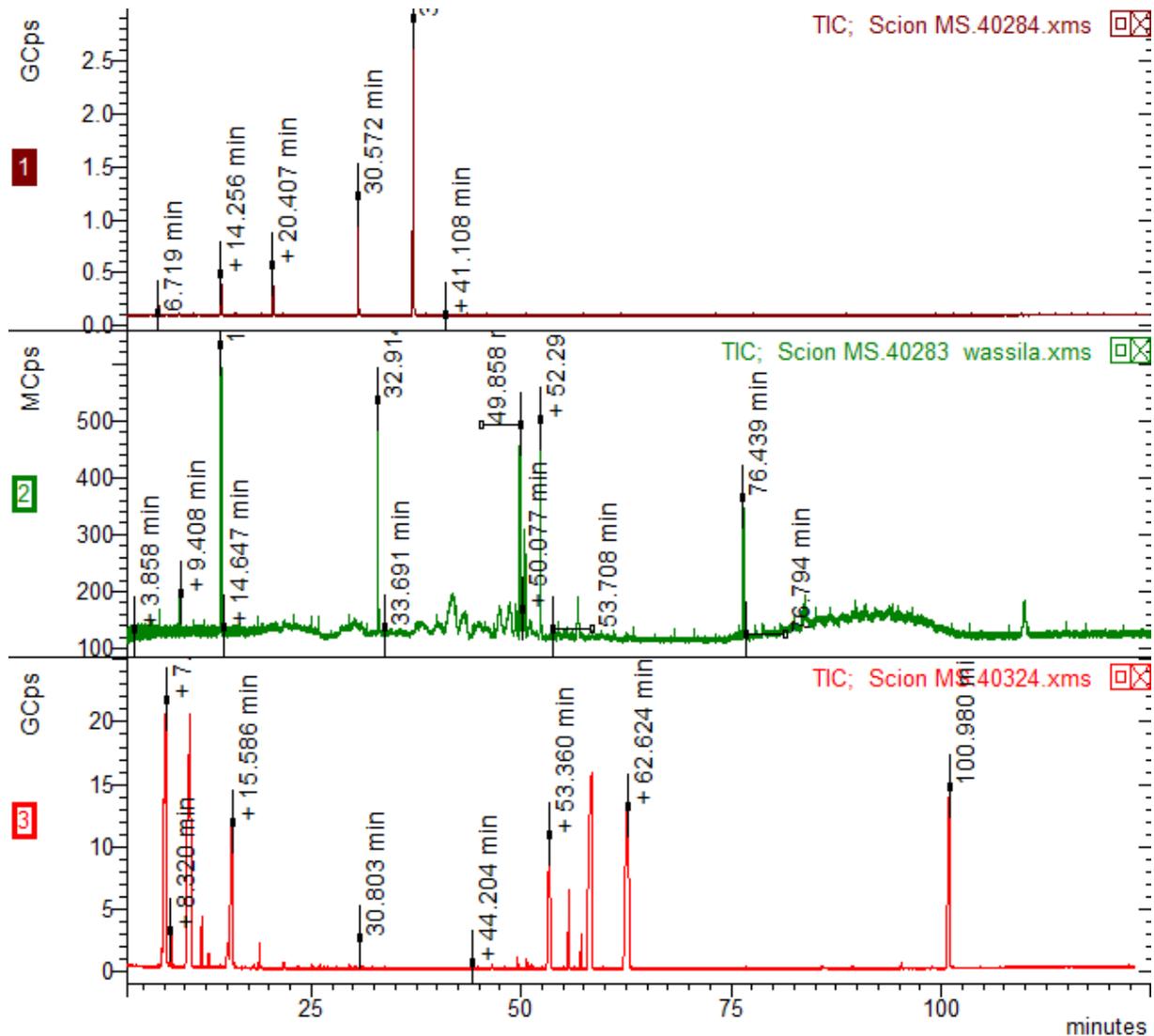
Système de solvants : un mélange chloroforme : benzène (75:25, v/v)

Adsorbant : gel de silice

Spot N°	Huile de feuilles de persil obtenue A	Huile de feuille de persil achetée B	Huile de graine de persil obtenue C	Huile de graine de persil achetée D	Huile de fenouille E
1	D <sub>1</sub> = 3.9cm Rf <sub>1</sub> =0.26	D <sub>1</sub> =1.1cm Rf <sub>1</sub> =0.07	D <sub>1</sub> = 1.8cm Rf <sub>1</sub> = 0.12	D <sub>1</sub> = 1.2cm Rf <sub>1</sub> = 0.08	D <sub>1</sub> =1.1cm Rf <sub>1</sub> = 0.07
2	D <sub>2</sub> = 5.8cm Rf <sub>2</sub> =0.38cm	D <sub>2</sub> =2.5cm Rf <sub>2</sub> = 0.16	D <sub>2</sub> = 3.5cm Rf <sub>2</sub> =0.23	D <sub>2</sub> =2.4cm Rf <sub>2</sub> =0.16	D <sub>2</sub> =2.3cm Rf <sub>2</sub> = 0.15
3	D <sub>3</sub> = 11.5cm Rf <sub>3</sub> =0.76	D <sub>3</sub> =5cm Rf <sub>3</sub> = 0.33	D <sub>3</sub> = 5.5cm Rf <sub>3</sub> =0.36	D <sub>3</sub> =7.5cm Rf <sub>3</sub> =0.5	D <sub>3</sub> =3.7cm Rf <sub>3</sub> =0.24
4	D <sub>4</sub> =13.1cm Rf <sub>4</sub> =0.87	D <sub>4</sub> =11.9cm Rf <sub>4</sub> =0.79	D <sub>4</sub> = 9.3cm Rf <sub>4</sub> =0.62	D <sub>4</sub> =11.5cm Rf <sub>4</sub> = 0.76	D <sub>4</sub> =7.5cm Rf <sub>4</sub> = 0.5
5	D <sub>5</sub> =14.4cm Rf <sub>5</sub> =0.96	D <sub>5</sub> = 14.4cm Rf <sub>5</sub> = 0.96	D <sub>5</sub> =11.8cm Rf <sub>5</sub> =0.78	D <sub>5</sub> =14.5cm Rf <sub>5</sub> = 0.96	D <sub>5</sub> =11.3cm Rf <sub>5</sub> = 0.75
6			D <sub>6</sub> =13.1cm Rf <sub>6</sub> =0.87		D <sub>6</sub> =14.5cm Rf <sub>6</sub> = 0.96
7			D <sub>7</sub> =14.4cm Rf <sub>7</sub> = 0.96		

#### IV.4.1.3.4. Caractérisation phyto-chimique par chromatographique (CPG/SM)

L'identification des produits contenus dans l'essence de persil a été réalisée par la méthode (CPG/SM) (figure 22).



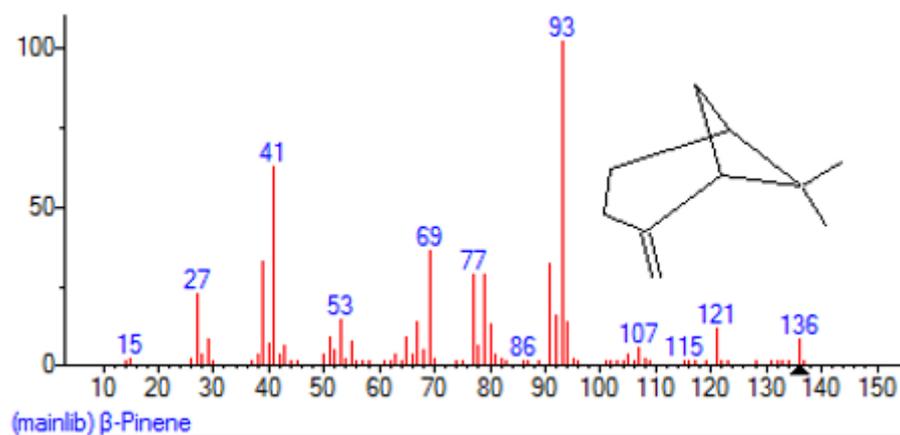
**Figure 22 :** Chromatogramme en impact électronique des différentes huiles essentielles  
 1. Chromatogramme en impact électronique de l'HE de fenouille (Smahi, 2018)  
 2. Chromatogramme en impact électronique de l'HE de feuilles de persil achetée à la pharmacie.  
 3. Chromatogramme en impact électronique de HE de graines de persil obtenue.

Le profil aromatique de l'huile essentielle de persil obtenue est très variable et les monoterpènes étaient prépondérants (51.40%) et en plus grande quantité que les phénylpropanoïdes (37.58%) ; avec un pourcentage très faible de sesquiterpènes (1.03%).

Les mono-terpènes sont aliphatiques, acycliques (myrcène, trans- $\beta$ -Ocimene), monocycliques ( $\beta$ -Phellandrène, cymène,  $\gamma$ -Terpinene) ou bicycliques ( $\alpha$  et  $\beta$ -pinène, camphène, Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-méthyl-1-(1-méthylethyl)-).

D'après les résultats obtenus, vingt composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de persil qui représentaient un total de 98.069% et regroupés selon leur structure chimique en six classes (hydrocarbures monoterpéniques-C1, monoterpènes oxygénés-C2, hydrocarbures sesquiterpéniques-C3, sesquiterpène oxygénés-C4, phénylpropanoïdes-C5, et phtalate-C6).

Les pinènes (fig. 23) étaient les mono-terpènes dominants avec près de (37.83%); suivis par l'apiol (15.40 %); Allyltetraméthoxybenzène (14.72 %);  $\beta$ -Phéllandrène (8.11 %); Bis(2-éthylhexyl) phthalate (7.47 %); Myristicine (7.46 %); trans- $\beta$ -Ocimène (2.70 %);  $\beta$ -Myrcène (1.00 %) et  $\gamma$ -Terpinène (0.57 %). Ces résultats confirmaient réellement les résultats d'analyse obtenus par CCM.



**Figure 23 :** Spectre de masse en (IE) du composé majoritaire ( $\beta$ -Pinène) de l'HE de persil

Le tableau. 27 illustre le temps de rétention, le pourcentage de chaque pic, ainsi que le composé identifié pour chaque essence.

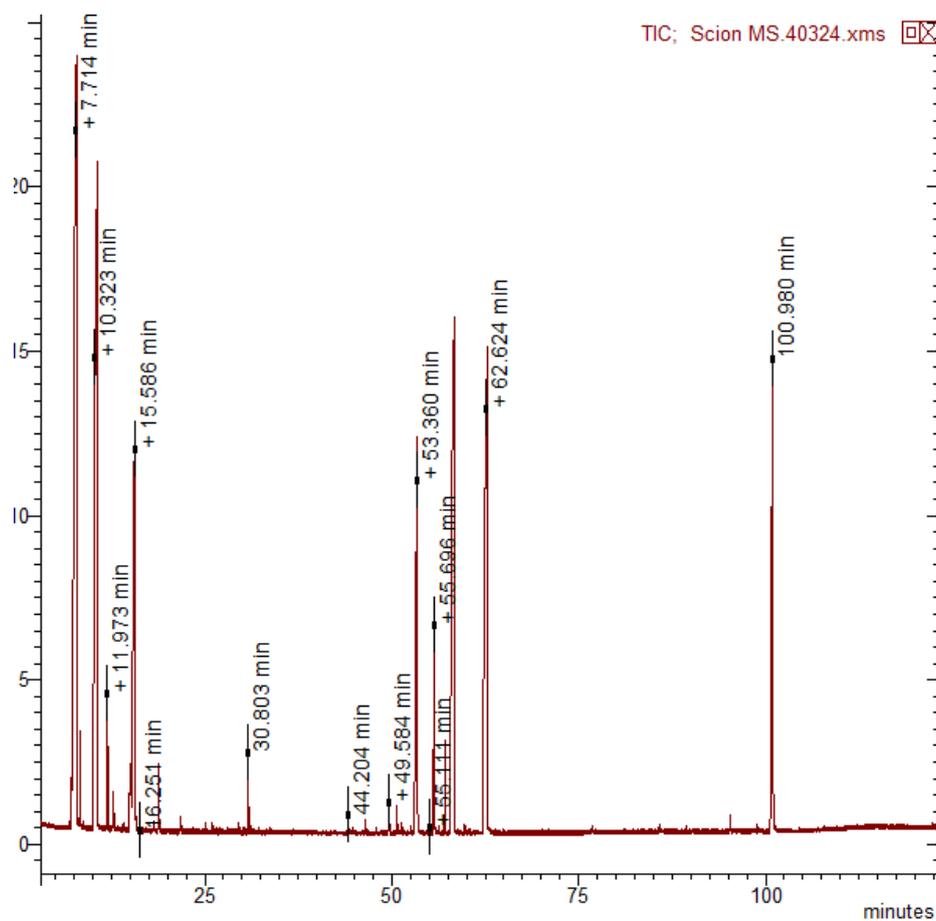
**Tableau 27 :** Analyse par CPG –SM de l'HE de persil

N° de pic	CC	Tr	%	Composés identifiés	Formule chimique
1	C1	7.213	0.506	Bicyclo [3.1.0] hex-2-ene, 4-méthyl-1-(1-méthylethyl)-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	C1	7.468	2.702	trans-β-Ocimène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	C1	7.714	17.979	(1R)-2, 6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene. Synonyme : 1R-α-Pinène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	C1	8.319	0.481	Camphène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	C1	10.323	19.854	β-Pinène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	C1	11.973	1.000	β-Myrcène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	C1	15.037	0.129	o-Cymène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	C1	15.586	8.115	β-Phellandrène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
9	C1	18.844	0.571	γ-Terpinène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	C1	21.795	0.071	Benzène, 1-méthyl-4-(1-méthylethenyl)- Synonyme : p-Cymenène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
11	C2	30.803	0.565	Bicyclo [3.1.1]hept-2-ene-2-carboxaldéhyde, 6,6-diméthyl	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
12	C3	49.584	0.174	E)-β-Famesène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
13	C3	50.667	0.147	Naphthalène, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-diméthyl-2-(1-méthylethenyl)-, [2R-(2α,4α,8αβ)]-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>

<b>14</b>	C5	53.360	7.462	1,3-Benzodioxole, 4-méthoxy-6-(2-propényl)-Synonyme : Myristicine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
<b>15</b>	C4	57.134	0.713	Carotol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
<b>16</b>	C5	58.373	14.72	Benzène, 1,2,3,4-tétraméthoxy-5-(2-propényl)-Synonyme : Allyltetraméthoxybenzène	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>
<b>17</b>	C5	62.624	15.401	Apiol	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
<b>18</b>	C6	100.980	7.479	Bis (2-éthylhexyl) phthalate	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
<b>Total identifiés</b>			<b>98.069</b>		

CC : classe chimique ; C1 :hydrocarbures monoterpéniques ; C2 :monoterpènes oxygénés ;C3 :hydrocarbures sesquiterpéniques ;C4 :sesquiterpène oxygénés ;C5 :phénylpropanoïdes ; C6 : phthalate ; RT :temps de rétention ; % : pourcentage .

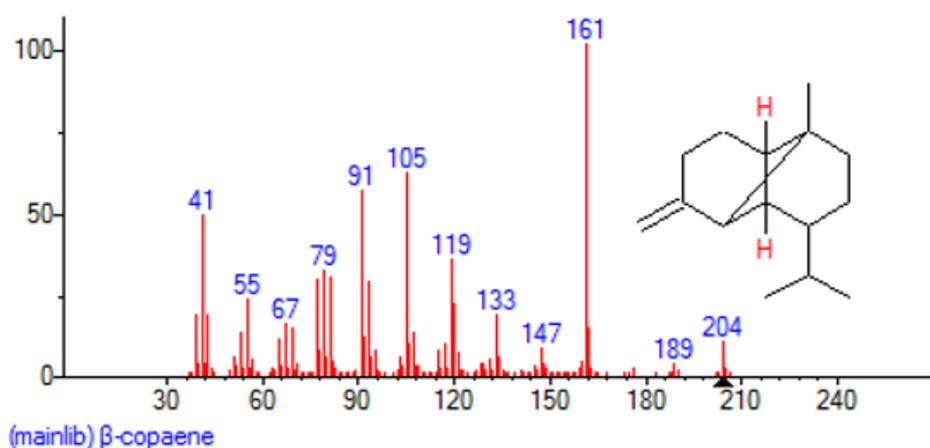
Les résultats des analyses, par CPG/MS-IE, montraient un chromatogramme de l'HE de persil représenté sur la figure 24 révélant 20 pics (ou 20 composés identifiés).



**Figure 24 :** Chromatogramme en impact électronique de l'HE de persil

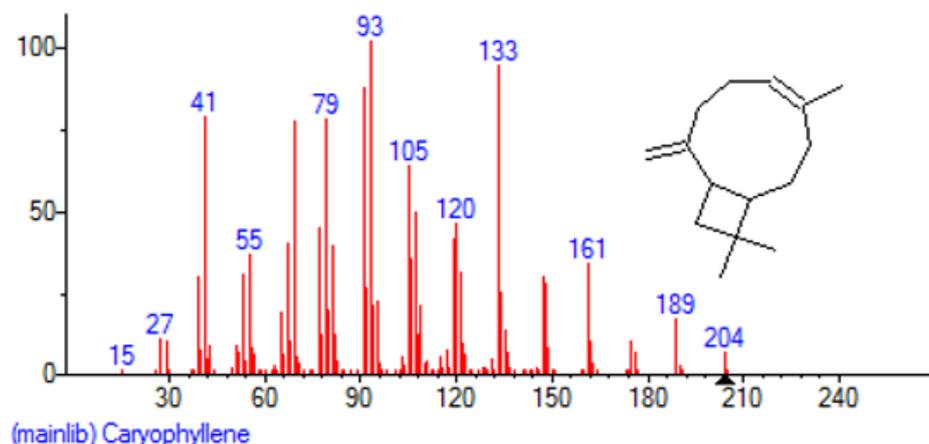
Deux hydrocarbures sesquiterpéniques ont été identifiés par CPG /SM -IE :

- ❖ Tr = 44,204 est relatif au  $\beta$ -copaène



**Figure 25:** Spectre de masse en (IE) de Tr =44,204

❖ Tr = 46,521 est relatif au Caryophyllène



**Figure 26 :** Spectre de masse en (IE) de Tr =46 ,521

#### IV.4.1.3.4.1. Comparaison entre la composition chimique de l'HE de persil avec des essences étrangère

Le tableau. 28 regroupe les principaux constituants des HE.s de persil provenant de différents pays (Tadros et *al.*, 2017 ; Linde et *al.* , 2016 ; Craft et Setzer , 2017 ; Ouis , 2015)

**Tableau 28 :** Pourcentages des constituants des HE.s étrangères du persil (Tadros et *al.*, 2017 ; Linde et *al.* , 2016 ; Craft et Setzer , 2017 ; Ouis , 2015)

Pays / Constituants	Egypte (%) Étudiée(%)	USA(%)	Brazil(%)	Algérie(%)	Essence
$\alpha$ -Pinène	13.1	1.1	2.1	6.09	17.979
$\beta$ -Pinène		0.6	1.3	6.01	19.854
Camphène	–		–	–	0.481
$\beta$ -Myrcène	–	3.2	4.4	–	1.000
o-Cymène	–	0.2	0.4	–	0.129
$\beta$ -Phellandrène	–	31.7	14.6	–	8.115
Bicyclo[3.1.0]	0.31	–	–	–	0.506
hex-2-ene, 4-méthyl- 1-(1-méthylethyl)-					
(E)- $\beta$ -Famesene	–	–	–	–	0.174
Naphthalène, 1,2,3,4,4a,5,6,8 a-octahydro- 4a,8-diméthyl-	1.14	–	–	–	0.147

2-(1-méthylethényl)-, [2R-(2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )]-					
Myristicine	18.46	39.4	14.0	16.63	7.462
Carotol	–	–	0.3	–	0.713
Benzène, 1,2,3,4-tetraméthoxy- 5-(2-propényl)-	3.51	–	–	27.78	14.72
Apiol	45.21	0.7	50.3	23.55	15.401
Bis (2-ethylhexyl) phthalate	19.76	–	–	–	7.479
Bicyclo[3.1.0] hex-2-ene, 4-méthyl- 1-(1-méthylethyl)-	–	–	–	–	0.506
Trans- $\beta$ -Ocimène	–	–	–	–	2.702
$\gamma$ -Terpinen	–	–	–	–	0.571
Benzène, 1-méthyl -4-(1-méthylethényl)- Synonyme : p-Cymenène	–	–	–	–	0.071

Tadros et *al.* (2017) ont rapporté dans leurs travaux porté sur l'huile essentielle de persil provenant du marché en Egypte que la composition de cette huile était de : 45.21% de l'apiol, 19.76 de di -n-octyl phthalate, 18.46% de myristicine ,4.56% de carvone et 4.22% de 1,4-benzenediamine.

Linde et *al.* (2016) ont suggéré que l'HE de la partie aérienne de persil contenait 50.3% de l'apiol, 14.0 % de myristicine et 14.6% de  $\beta$ -phéllandrène.

Craft et Setzer (2017) ont pu identifier plusieurs composés dans l'huile essentielle de persil provenant des USA. Elle contenait 39.4% de myristicine ,31.7% de  $\beta$ -phéllandrène et 14.9% de 1,3,8-p-menthatriène.

Une autre étude a été réalisée par Ouis et *al.* (2015) en Algérie sur les HE.s de graines de persil dont l'allyltétraméthoxybenzène était le produit dominant avec 27.78%, suivi par l'apiol avec 23.55%. En revanche, l'essence de persil frais contenait principalement de l'apiol.

Selon Semeniuc et *al.* (2018) l'huile essentielle de persil renfermait plus d'hydrocarbures mono-terpéniques (97.2%), suivis par les mono-terpènes oxygénés (0.9%), les phénylpropanoïdes (0.8%) et les hydrocarbures sesqui-terpéniques (0.4%).

Par comparaison des résultats obtenus à ceux cités dans la littérature, il est à noter une variation dans les taux des principaux constituants essentiellement pour le pinène, l'apiol et la myristicine. Ceci peut être dû à l'influence de plusieurs facteurs : les conditions climatiques, la région géographique et le mode d'extraction (Si, 2012).

#### **IV.4.1.3.5. Analyse chromatographique par LC-SM**

Les acides phénoliques et les flavonoïdes de l'extrait de feuilles de persil ont été identifiés et quantifiés par LC-SM (tableau 29 ; fig.27).

L'identification chromatographique a permis de caractériser les principaux composés de l'extrait de feuilles de persil qui était très riche en flavonoïdes (95.3%) ; les flavonols étaient les composants majeurs des flavonoïdes (50.23%) suivis par les isoflavones (32.94%). Leur diversité structurale et leurs bonnes stabilités ; leur ont conféré des propriétés chimiques et biologiques très importantes.

D'après les résultats obtenus, treize flavonoïdes ont été identifiés : génisteine (32.94%) , kaempférol (27.82%) , méthyl – quercétine (15.13%) , quercétine (7.28%) , quercétine bis-méthylée (3.44%) , apigénine 4' diméthyl –éther (2.79%), Pinobanksin -3- Acetate (1.64%) , naringénine ( 1.61%) , méthoxy – pinobanksin ( 1.05%), tectochrysin ( 0.8%) , pinocembrine (0.62%) , catéchine (0.13%) , chrysin ( 0.05%) , ; trois acides phénoliques (4.65%) : prényl caféate (3.17%) , acide caféique (1.4%) , tyrosol (0.08%) ; et un acide palmitique : acide hexadécanoïque ( 0.07%).

En 2017, Tadros et *al.* ont montré que l'extrait alcoolique (méthanol) de persil analysé par HPLC était constitué de : 21468 µg / g de l'acide rosmarinique , 4313.7 µg / g de naringine, 2894.50 µg / g de reversetrol , 1043.46 µg / g de benzoïque, 1016.56 µg / g de pyrogallol, 970.46 µg / g d' acide ellagique et 434.9 µg / g d'acide salicylique .

Selon Trifunski et Ardelean (2012) l'extrait alcoolique (éthanol) de persil renfermait plus de polyphénols et flavonoïdes ; ce qui suggérait leur activité anti-oxydante.

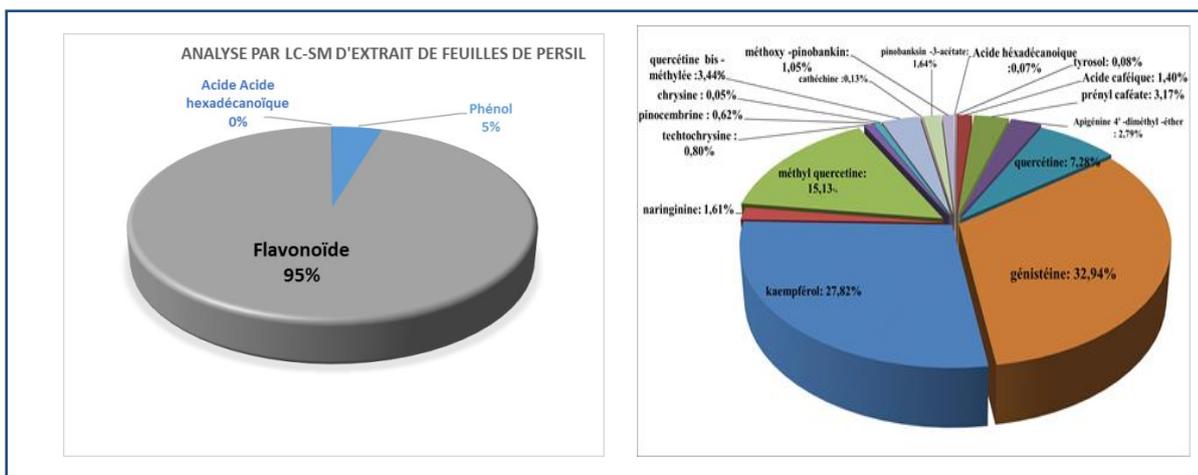
Stan et ses collaborateurs. (2012) ont pu identifier quatre flavonoïdes, à savoir ; l'apigénine, la lutéoline, la quercétine et le kaempférol dans l'extrait alcoolique (éthanol) de feuilles de persil (50:50, v / v) ; tandis que Hozayen et *al.* ( 2016) ont montré la présence de seize composés dans l'extrait aqueux de persil (lutéo.6-arabinose8-glucose, lutéo.6-glucose8-arabinose, apig.6-rhaminose8-glucose, apig.6-glucose8-rhaminose, naringine, rutine, hespirdine, acide rosmarinique, apig.7-o-néohespiroside, apigénine-7-glucose, quercetrine, quercitine, naringénine, hespirtine, kampférol, apigénine) .

D'après une étude très récente réalisée par Marwa et *al.* ( 2019) l'extrait de persil analysé par HPLC contenait onze polyphénols ( acide gallique , catéchol , acide cafféique, acide

vanillique , acide benzoïque, vanilline, p- acide coumarique, acide férulique, o- acide coumarique, acide cinnamique, acide p-Hydroxybenzoïque ) avec une concentration de 99.84 ± 28.11 mg eq/ g extrait.

**Tableau 29 :** Composition chimique d'extrait de feuilles de *Petroselinum crispum* par LC-SM

Composés identifiés	formule	RT	ms	m/z	vol %
<b>Chimique</b>					
<b>Phénol</b>					
Tyrosol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	14.434	138.0677	13.0749	0.08
Acide Caféique	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	12.222	360.0843	181.0495	1.4
Prénylcaféate	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	11.832	992.4217	249.1126	3.17
<b>Flavonoïdes</b>					
Apigénine4'-diméthyl-Ether	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	11.783	568.1584	285.0763	2.79
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	11.936	302.0432	303.0505	7.28
Génistéine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	12.016	540.1064	271.0604	32.94
Kaempférol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	12.287	572.0964	257.0807	27.82
Naringénine	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	12.139	816.2069	273.0757	1.61
Méthylquercétine	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	12.481	632.1178	317.0662	15.13
Quercétine bis-méthylée	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	12.341	1320.2976	331.0812	3.44
Tectochryrine	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	11.847	1072.2953	269.0819	0.8
Pinoembrine	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	12.078	768.2215	257.0654	0.62
Chryrine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	14.351	254.0582	255.0654	0.05
Catéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	12.036	290.0804	269.0803	0.13
Pinobanksin-3-acétate	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2.01	628.1587	315.0687	1.64
Méthoxy-pinobanksin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	12.045	286.0841	287.0913	1.05
<b>Autre composants</b>					
Acide hexadécanoïque	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	14.524	256.2404	274.2742	0.07



**Figure 27 :** Analyse quantitative de l'extrait de feuilles de *Petroselinum crispum* utilisé en chromatographie LC/SM

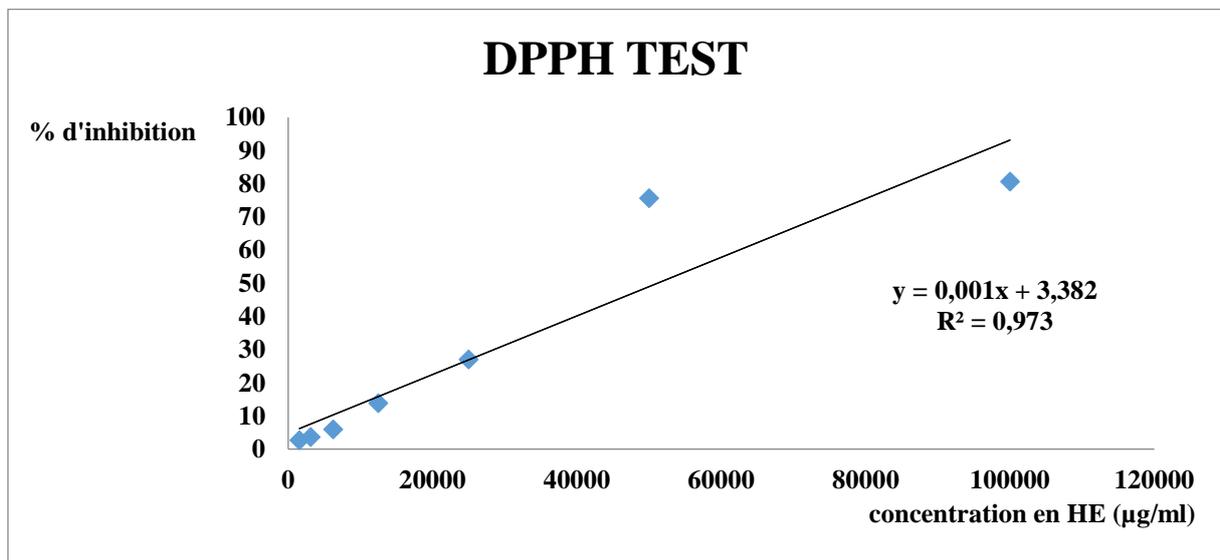
#### IV.4.1. Analyse biologiques

##### IV.4.1.1. Evaluation *in vitro* des activités biologiques de l'extrait brut (EEP) et l'huile essentielle de *Petroselinum crispum*(HE.P)

###### IV.4.1.1.1. Effets antioxydants de l'huile essentielle de *Petroselinum Crispum* (piégeage du radical DPPH•)

Les profils de l'activité anti-radicalaire obtenus révélèrent que l'huile essentielle testée possédait une activité dose – dépendante. Les faibles doses de l'HE de persil semblaient avoir un faible effet sur la réduction du DPPH• contrairement aux fortes doses 50 000µg/ml et 100 000µg/ml où le taux d'inhibition (%) était très élevé et il atteignait respectivement les 75.62 % et 80.58 %.

Un suivi cinétique de la réaction de réduction, pour l'évaluation du pourcentage d'inhibition, a été réalisé trois fois.



**Figure 28:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'HE de *Petroselinum crispum*

###### IV.4.1.1.2. Effets antioxydants de l'extrait hydro- alcoolique de *Petroselinum crispum* (Piégeage du radical DPPH•)

La figure ci-dessous montre une forte activité inhibitrice du radical DPPH par l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) de feuilles de persil avec un taux d'inhibition dépassant 71% pour la concentration de 100 000µg/ml.

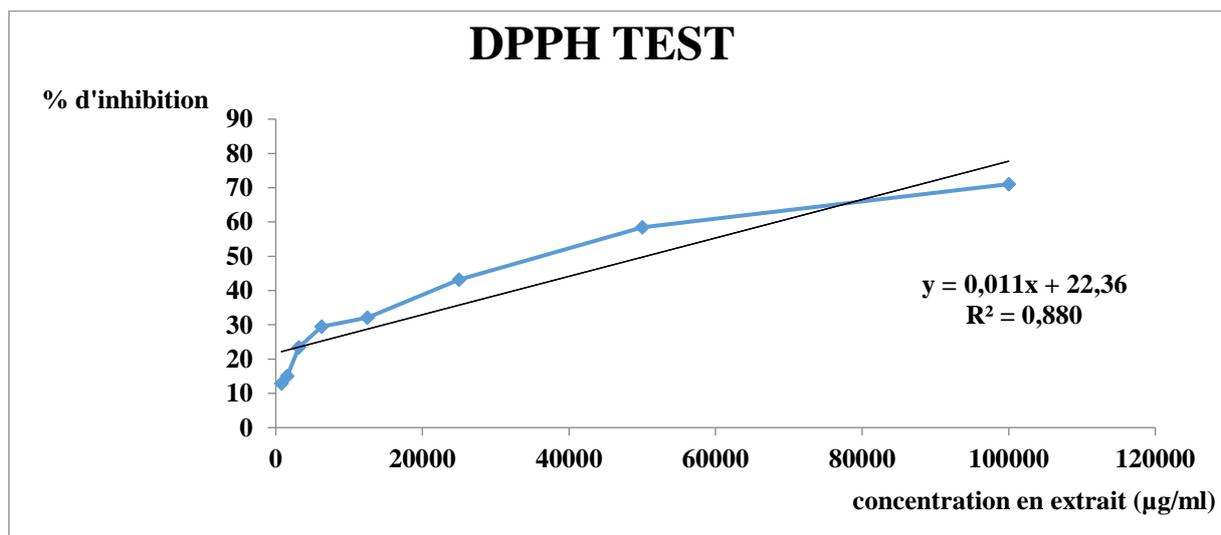
Les tests phyto-chimiques ont montré que les extraits de persil étaient riches en flavonoïdes, des tanins, des stérols, et / ou tri terpènes, et tous ces constituants sont connus pour exercer une activité anti-oxydante et conférer une protection contre les dommages cellulaires, et

exercer des effets de piégeage des radicaux (Abou Seif, 2014). En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. L'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libre (R<sup>•</sup>) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxy (FLO<sup>•</sup>) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH). Le FLO<sup>•</sup> subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation des radicaux aroxy (Beddou, 2015).

Les flavonols étaient les prédominants pigments identifiés dans le persil. Leurs structures partielles contribuent à leurs forte activité de piégeage des radicaux libres (Kosseva, 2013) :

- une structure o-dihydroxyle dans le cycle B (structure catéchol) comme site cible de radicaux libres ;
- une double liaison 2,3 avec conjugaison à un groupe 4-oxo, qui est nécessaire pour la délocalisation d'un électron non apparié du cycle B ;
- des groupes hydroxyle en position 3 et 5, qui sont nécessaires pour l'amélioration de l'activité de piégeage des radicaux libres.

Suivis par les isoflavones, la génistéine le composant majeur de persil, agit directement comme antioxydant par le biais d'un don d'atomes d'hydrogène du groupe hydroxyle attaché au cycle benzène, protégeant ainsi contre les dommages oxydatifs (Gun-Ae, 2014).



**Figure 29:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH<sup>•</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait de *Petroselinum crispum*

#### **IV.4.1.1.3. Détermination de l'index CI<sub>50</sub>**

Les valeurs des CI<sub>50</sub>, présentées dans le tableau 30, permettaient d'évaluer et de comparer l'efficacité de l'extrait brut et l'huile essentielle. A rappeler, que l'index CI<sub>50</sub> est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire l'activité du DPPH initiale de 50% après 30 minutes d'action ; et plus que la valeur de la CI<sub>50</sub> est faible plus l'extrait est puissant vis –à –vis les radicaux libres (Beddou, 2015).

**Tableau 30 :** Valeurs des CI<sub>50</sub> d'EEP et HE.P

	Extrait de persil (EEP)	Huile essentielle de persil(HE.P)
CI <sub>50</sub> µg /ml	2512,7272	46,618

Au vu de ces résultats, il a été révélé que l'HE de persil détenait la capacité anti-oxydante la plus élevée par rapport à l'extrait étudié. Ceci est montré par les CI<sub>50</sub> de cette plante qui étaient 2512,72 µg /ml et 46,61 µg /ml de l'extrait brut et l'huile essentielle respectivement. Cela est directement lié à sa plus grande teneur en mono-terpènes qui sont des agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydant.

En effet, Wojtunik et *al.* (2014) ont pu démontrer que les éléments structuraux des mono-terpènes étaient responsables de leur activité antioxydante et cela dépendait de la polarité de solvant utilisé dans les expériences.

L'étude menée par Ouis (2015) montrait que les huiles essentielles de *Petroselinum crispum* ont exercées une faible activité inhibitrice du radical DPPH avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre de 145,5 µg/ml .

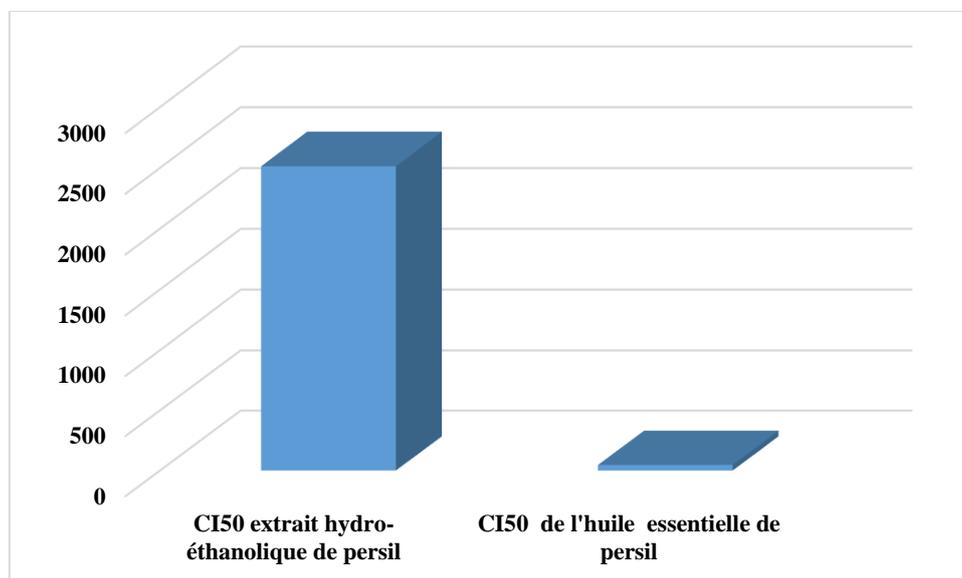
Semeniuc et *al.* (2018) ont rapporté dans leurs travaux que l'huile essentielle présentait une activité anti-oxydante accrue qui est du probablement aux mono-terpènes oxygénés et aux phénylpropanoïdes.

Selon Grassmann (2005), les antioxydants végétaux sont composés d'une grande variété de substances différentes comme l'acide ascorbique et les tocophérols, les composés poly-phénoliques ou les terpénoïdes. Ces composés peuvent être parmi les constituants de la plante étudiée.

Plusieurs travaux ont rapportés que l'huile de persil présentait une forte activité anti-oxydante pour toutes les concentrations testées suivi par la lavande et la fenouille. Cela est dû au hydrocarbures mono-terpènes qui sont des antioxydants plus efficaces que les sesquiterpènes et les composants non-isoprénoïdes (Irene, 2016 ; Viuda-Martos et *al.* , 2010 )

Il était établi que les composés phénoliques agissaient comme anti-oxydants (Gomez et *al.*, 2006), mais ils ne sont pas entièrement responsables de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles. Ainsi, la très forte inhibition de l'oxydation de DPPH par l'huile essentielle de persil, pourtant très peu concentrée en polyphénols, peut être attribuée à d'autres substances à potentiel antioxydant qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

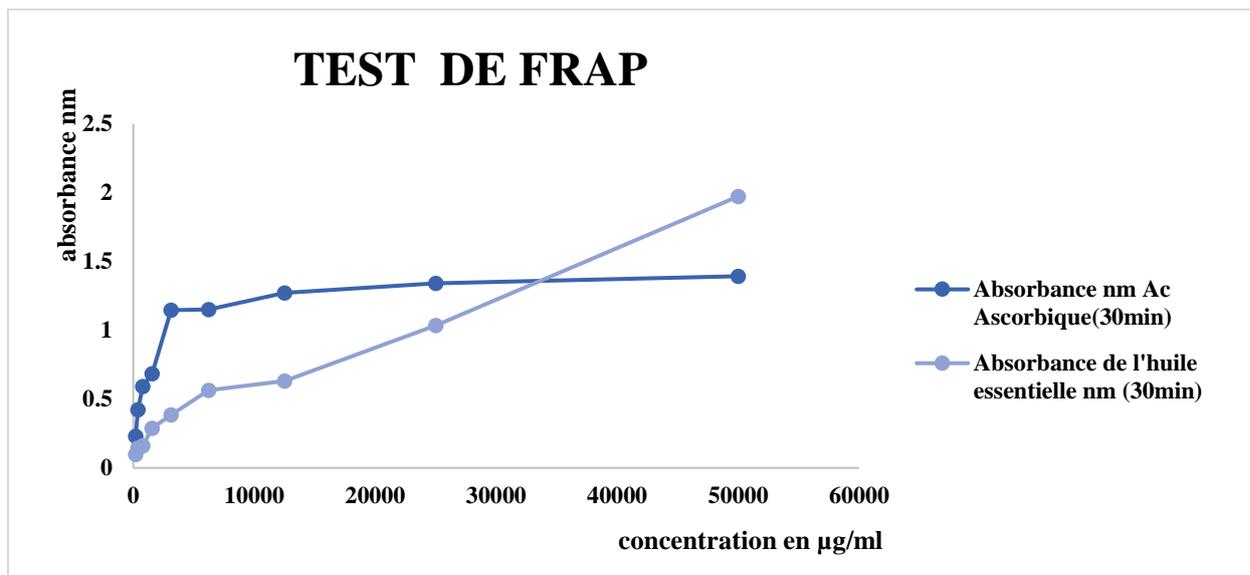
En outre, ces résultats du pouvoir antioxydant pouvaient être fortement influencée non seulement par la composition chimique, mais également par les conditions expérimentales (Température de réaction, rapport antioxydant/DPPH, type de solvant, pH, concentration en échantillon) (Popovici et *al.* , 2009 ; Noipa et *al.*, 2011 ; Costa et *al.* ,2012).



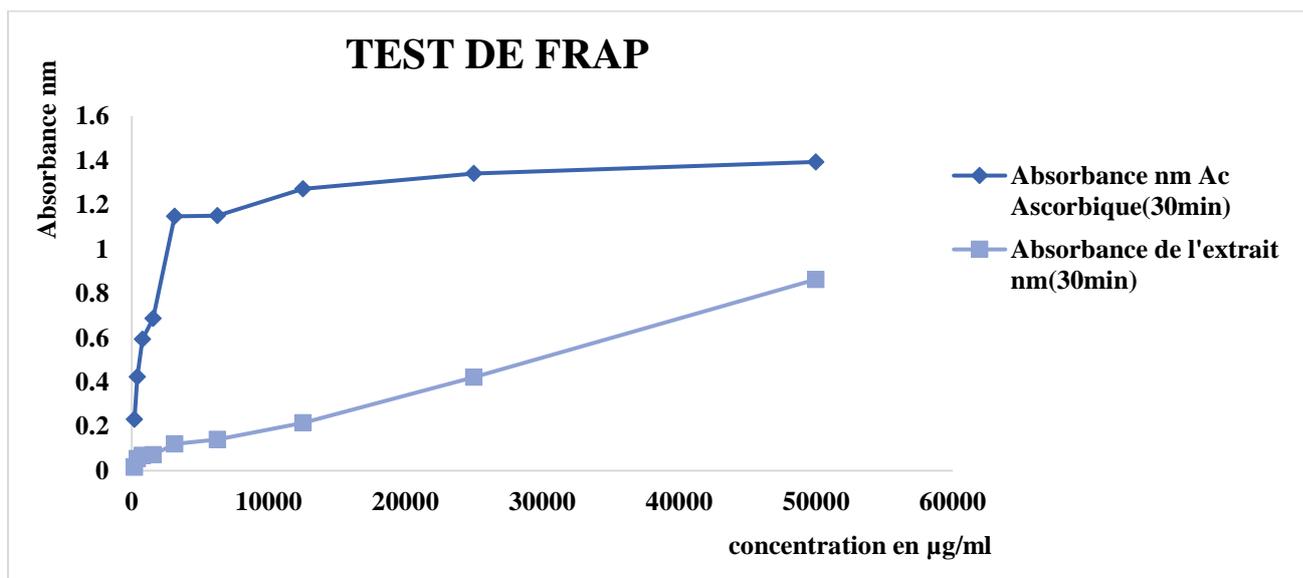
**Figure 30 :** Valeurs de CI<sub>50</sub> pour l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) et l'huile essentielle de *Petroselinum crispum*

#### **IV.4.1.1.4. Activité anti-oxydante de l'huile essentielle et l'extrait brut par réducteur de fer (FRAP)**

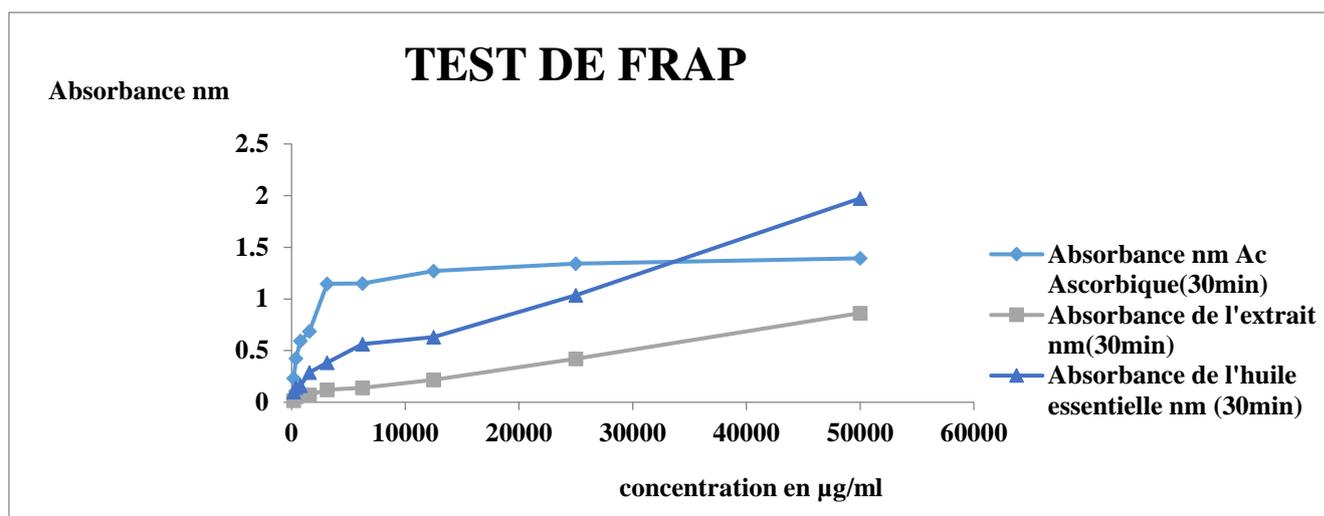
L'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés analysés a été déterminée par la méthode de réduction de fer. Les résultats de l'activité réductrice des différents extraits de la plante étudiée sont mentionnés dans les figures 31 ,32 et 33. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes des absorbances en fonction des concentrations.



**Figure 31 :** Réduction de fer de l'HE.P et de l'acide ascorbique



**Figure 32:** Réduction de fer de l'extrait et de l'acide ascorbique



**Figure 33 :** Réduction de fer de l'extrait, HE.P et de l'acide ascorbique

D'après les graphes de la figure 35, l'huile essentielle de persil a présenté le plus d'activité pour réduire le fer suivi par l'acide ascorbique et l'extrait hydro-éthanolique.

La puissance de réduction de fer des extraits utilisés par rapport à l'acide ascorbique peuvent être classés, selon l'ordre suivant : l'huile essentielle (HE.P) > acide ascorbique > extrait brut de persil (EEP).

Dans cette étude, l'augmentation de la réduction du fer était proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'extrait et l'HE de persil. De ce fait, il est suggéré que l'extrait des feuilles et l'HE de persil possédaient une activité anti-oxydante très intéressante avec la technique FRAP.

Il est évident que la forte activité de ces extraits est attribuée à leur richesse aux composés mono-terpéniques hydrocarbonés et phénylpropanoïdes (Semeniuc et *al.*, 2018) pour les huiles essentielles ; et composés phénoliques pour l'extrait hydro-alcoolique, qui possédait la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols, flavonoïdes); ces molécules polaires contribuent à l'augmentation de l'activité anti-radicalaire( Arous, 2012) .

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirmaient le potentiel antioxydant important des huiles essentielles par rapport à l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) de la plante *Petroselinum crispum*. En effet, les tests montraient que ces huiles possédaient une bonne affinité avec les ions  $Fe^{3+}$ . Cette capacité de réduction des radicaux libres est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés mono-terpéniques hydrocarbonés et phénylpropanoïdes. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydoréduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier.

En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle était à l'origine du pouvoir antioxydant. En outre, certains constituants des huiles essentielles tels que les hydrocarbonés possèdent aussi une forte activité anti-oxydante (Vardar-Ünlü, 2003).

Irene et *al.* (2016) ont rapporté que l'huile essentielle de persil présentait une très forte activité anti-oxydante par rapport aux huiles essentielles de la lavande et de fenouille avec une forte concentration d'inhibition % de FRAP (0.93 mmol/L Trolox).

#### **IV.4.1.1.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes font l'objet d'études continues afin de les utiliser comme bio-pesticides pour les plantes ou médicaments candidats potentiels pour surmonter le problème de la multi-résistance microbienne aux médicaments notamment les antibiotiques chez l'homme (Khalil et *al.*, 2017).

D'après une étude très récente, le biologiste marocain Remmal qui a remporté le Prix de l'inventeur européen 2017, a eu l'idée de "doper" les antibiotiques aux huiles essentielles, créant un nouveau complexe moléculaire que le mécanisme de résistance mis en œuvre par les bactéries ont de la peine à reconnaître. Les bactéries pourraient alors difficilement développer des résistances efficaces contre le traitement anti infectueux.

L'objectif de cette présente étude est de différencier les extraits en fonction de leur potentiel antimicrobien respectif par la méthode de diffusion sur disques. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extrait végétaux.

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'antibiotique utilisé, l'extrait et l'HE de *Petroselinum crispum* relatives aux souches microbiennes testées ont été rapportés dans le tableau .31 .

**Tableau 31 :** Diamètres des zones d'inhibitions de l'extrait et l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* relatives aux différentes souches selon la méthode des disques

Diamètre des zones d'inhibitions (mm)								
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Citrobacter Frenzii</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Klebsiella Pneumonie</i>	<i>Enterobacter Cloacae</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Candida albicans (IP444)</i>	<i>Candida albicans (ATCC 10231)</i>
C <sub>1</sub> Ex	08	06	06	06	06	12	12	12
C <sub>2</sub> Ex	08	06	06	06	06	10	12	12
C <sub>3</sub> Ex	07	06	06	06	06	09	06	06
C <sub>4</sub> Ex	06	06	06	06	06	06	06	06
C <sub>1</sub> HE	13	06	06	09	07	08	06	09
C <sub>2</sub> HE	12	06	06	11	06	07	06	08
C <sub>3</sub> HE	11	06	06	08	06	07	06	08
C <sub>4</sub> HE	11	06	06	08	06	07	06	07
DMSO	06	06	06	06	06	06	06	06
Gent (500µg/disque)	30	35	35	25	28	40	35	30

DMSO :Diméthylsulfoxyde ( contrôle négatif) ; Gent : Gentamicine (contrôle positifs ) ;Ex :Extrait ;HE :Huile Essentielle ;C<sub>1</sub>=100mg /ml ;C<sub>2</sub>=50mg/ml ;C<sub>3</sub>=25mg/ml ;C<sub>4</sub>=12.5mg/ml

D'après Tekwu et al. (2012)un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Toutes les zones d'inhibition étaient inférieures à celles de l'antibiotique de référence gentamicine, qui a montré de grandes zones d'inhibition comprises entre 25 et 40 mm.

L'extrait hydro-alcoolique (éthanol) de *Petroselinum crispum* (EEP) agissait moyennement actif sur les deux souches bactériennes à Gram - :*Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. Les autres souches bactériennes se sont révélées résistantes à EEP. Cela pourrait s'expliquer soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes soit par la faible capacité des composés antibactériens, présents dans l'extrait, à diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha et al., 2000) .

L'huile essentielle de persil présentait une certaine sensibilité contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* avec des diamètres compris entre 8 et 13 mm. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Petrolini et al.( 2013).

Selon Bouhekrit (2018), l'activité biologique d'une huile essentielle dépendait de sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes composés terpéniques et cétoniques) et leurs effets synergiques. En outre, les composants des huiles essentielles de quantité plus faible pouvaient également contribuer à l'activité antimicrobienne, impliquant probablement un certain type de synergie avec d'autres composés actifs (Belmekki et al., 2013).

Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à leur accumulation au niveau des parois bactériennes qui perturbait ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires, menant aussi à la dégradation de la paroi cellulaire (Khalil et al., 2017), aux dommages de la membrane cytoplasmique, aux dommages des protéines membranaires et les fuites du contenu des cellules (Hellal, 2011).

Par ailleurs, une faible activité a été observée contre les levures responsables des mugquets et intertrigo. La paroi de *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae* (bactéries à Gram négatives) est très riche en lipopolysaccharides, qui empêchent les molécules comme les terpènes hydrophobes d'adhérer à celle-ci. D'ailleurs, ces microorganismes sont mobiles, il est probable que ces bactéries s'étaient déplacées profondément dans la gélose, et par conséquent elles s'échappaient ainsi à l'action des métabolites contenus dans les extraits.

La plus grande résistance de *Staphylococcus aureus* du Gram positive vis-à-vis de l'extrait et l'huile utilisés peut être expliquée par la structure de la paroi hétérogène de la bactérie : la présence de l'exo-polysaccharide contenant une couche externe (glycocalyx), la présence de certains composants comme l'acide teichoïques et quelques liens entre les divers composants donnent au polymère fortement réticulé de parois cette résistance (Perry et al., 2004 ; Beernesh et al., 1996).

Selon Brooks et Jefferson (2014), sa pathogénicité est liée à la formation de biofilm constitué particulièrement de polysaccharide intercellulaire adhésive (PIA), connu sous le nom de poly-N-acétyl- $\beta$ -(1-6)-glucosamine (PIA/PNAG), qui contribue également à la résistance à la phagocytose.

Contrairement aux résultats obtenus, une étude récente a été réalisée par Linde et al. (2016), rapportait que l'HE de *P. crispum* avait une activité bactériostatique vis à vis *Staphylococcus aureus*.

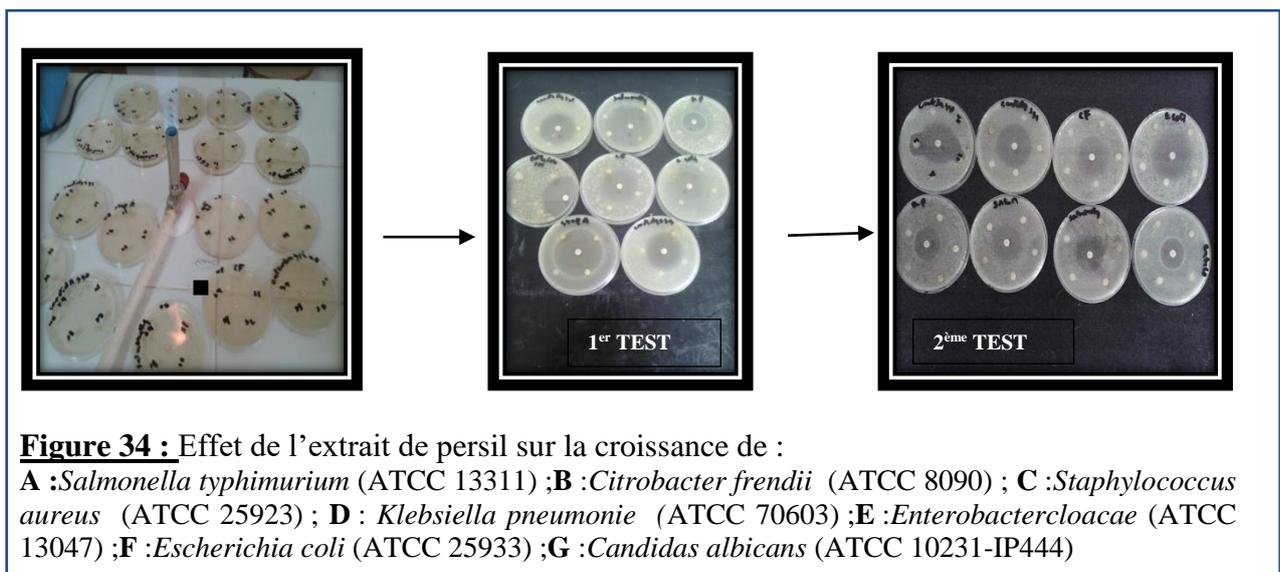
D'après les résultats du screening phyto-chimique obtenus, les extraits de l'espèce *Petroselinum* étudiés s'étaient avérés renfermant des métabolites secondaires biologiquement actifs regroupant spécifiquement les coumarines, les flavonoïdes et les huiles essentielles. Cette diversité de composés pourrait expliquer l'activité anti-microbienne de cette plante.

Traditionnellement, *Petroselinum crispum* était utilisée dans le traitement des infections urinaires. Par conséquent, l'inhibition de la croissance de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* permet de justifier au moins partiellement les usages ethno-pharmacologiques de cette plante.

Cependant, le mécanisme d'action des extraits et de leurs composés n'est pas totalement compris et les recherches se poursuivent encore. Mais d'autres auteurs ont avancé plusieurs hypothèses selon leurs observations :

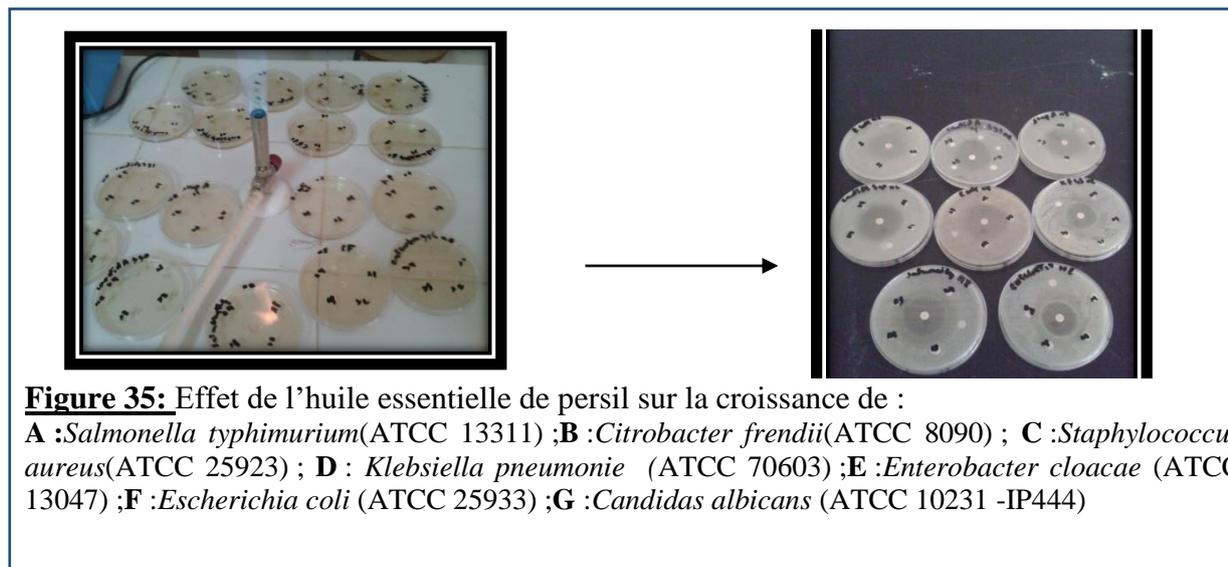
Une action sur le métabolisme énergétique (Gill et al., 2004), une interruption de la force proton motrice de la membrane cellulaire, une dénaturation non spécifique du cytoplasme de la paroi et de la membrane cellulaire (Manou et al., 1998) et une dénaturation des protéines par les composés phénoliques (Madigan et al., 1997).

D'autres auteurs mentionnaient une corrélation entre la structure et l'activité antibactérienne des molécules qui constituent les extraits et huiles essentielles par la présence de certains groupes fonctionnels: les composés aldéhydiques et phénoliques sont très actifs dans certains essais bien déterminés (Friedman et al., 2002), les structures phénoliques sont les plus actives sur les microorganismes, par la présence du groupe hydroxyle et sa position, les aldéhydes ont aussi une activité antimicrobienne puissante, la présence de l'oxygène dans les cétones augmente les propriétés antimicrobienne des terpènes (Dorman et al. , 2000) .



**Figure 34 :** Effet de l'extrait de persil sur la croissance de :

**A :** *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) ; **B :** *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) ; **C :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; **D :** *Klebsiella pneumonie* (ATCC 70603) ; **E :** *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047) ; **F :** *Escherichia coli* (ATCC 25933) ; **G :** *Candidas albicans* (ATCC 10231-IP444)



**Figure 35:** Effet de l'huile essentielle de persil sur la croissance de :  
**A :** *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311) ;**B :** *Citrobacter freundii*(ATCC 8090) ; **C :** *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923) ; **D :** *Klebsiella pneumonie* (ATCC 70603) ;**E :** *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047) ;**F :** *Escherichia coli* (ATCC 25933) ;**G :** *Candidas albicans* (ATCC 10231 -IP444)

#### IV.4.2.2. Evaluation *in vivo* des activités biologiques de l'extrait brut (EEP) et l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P)

##### IV.4.2.2.1. Observation de signes comportementaux

Les signes comportementaux observés chez les rats de chaque groupe sont illustrés dans le tableau. 32

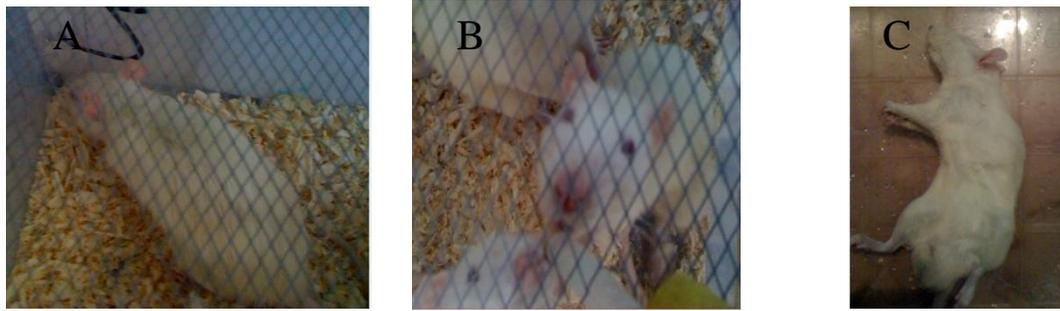
Plusieurs anomalies apparaissaient chez les rats intoxiqués par le cuivre. L'ensemble des rats ont montré des tremblements, une anorexie, une hyper-salivation, une dystonie, une chute de poils et une hypoactivité (fig.36).

Ces anomalies étaient moins fréquentes chez les rats des groupes G4 et G6. Tandis que, les rats des groupes G1, G3, G5 n'ont montré aucun signe de toxicité.

**Tableau 32 :** Signes pathologiques et comportementaux des rats au cours de l'expérimentation.

Groupes	Signes
G1	Normal
G2	Tremblements, anorexie, hyper-salivation, conjonctivite, rhinite, dystonie, chute de poils, hypoactivité.
G3	Normal
G4	hyper-salivation, mouvements choréiques.
G5	Normal
G6	Chute de poils, hyper-salivation.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.



**Figure 36 :** Le comportement des rats après 2 mois d'administration de sulfate de cuivre. A : somnolence et hypoactivité, B : hyper-salivation, conjonctivite et rhinite, C : anorexie et dystonie (observation avant la dissection).

#### **IV.4.2.2.2. Influence des traitements sur les variations des paramètres hématologiques**

##### **Résultats**

Le tableau .33 illustre les résultats de la formule numérique sanguine des rats témoins et traités. Après 60 jours de traitement, les résultats indiquaient clairement que le traitement avec le cuivre provoquait des variations dans la formule sanguine.

Une diminution très hautement significative ( $P < 0,01$ ) du nombre des érythrocytes de  $1.23 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  a été enregistrée chez les groupes traités avec le sulfate de cuivre par rapport aux témoins ( $6.01 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ ). Par ailleurs, une augmentation très hautement significative de ces valeurs a été observée chez les rats traités (HE.P +  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et (EEP +  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (G4 et G6) de  $2.1 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  et  $2.21 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  par rapport au G2 ( $4.78 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ ).

De même, les rats traités avec HE.P et EEP ont montrés un taux très significativement élevé de ces valeurs qui étaient respectivement de  $1.74 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  et  $1.11 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  par rapport au G1, surtout celui qui a été administré par HE.P ( $7.75 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ ) s'est révélé supérieur à celui du groupe témoin (G1).

En revanche, le cuivre a significativement fait diminuer les valeurs de l'hémoglobine (Hb) (8.72 g/dl) et l'hématocrite (Ht) (28.08 %) par rapport au G1 (11.9 g/dl et 34.36 %). Par contre, une augmentation très hautement significative de ces valeurs (36%, 28%) et (37%, 29%) a été détectée respectivement chez les groupes G4 (ayant reçu une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et HE.P) et G6 (ayant reçu une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et EEP) par rapport au G2. Le traitement uniquement par l'huile essentielle ou l'extrait augmente très significativement le pourcentage de Hb et Ht (2.48g/dl , 8.34%) pour G3 et (1.88g/dl , 6.14%) pour G5 par rapport au G1.

L'analyse du taux de volume globulaire moyen (VGM) a révélé l'existence d'une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) chez le groupe intoxiqué par  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (20.59 %) par rapport au groupe témoin (57.17 fL), ce qui indique une anémie macrocytaire. En revanche, une même diminution significative a été observée chez les lots traités par (HE.P +Cu) et (EEP +Cu) de 3% comparativement au G2 (58.69fL). D'autre part, une même diminution statistiquement significative a été constatée de ce taux chez les rats du G3 et G5 (0.5 %) comparativement aux rats du groupe témoin G1.

De plus, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyen hémoglobine (TGMH) étaient hautement significativement basses chez les rats du G2 (18.23 pg et 31.07 g/dl) par rapport au groupe témoin G1 (19.81pg et 34.65 g/dl) . Par contre, l'administration de l'huile essentielle et l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) ont entraîné une augmentation très hautement significative de ces valeurs chez les rats du G4 (19.84 pg et 34.86g/dl) et G6 (19.73 pg et 34. 57 g/dl) par rapport au G2.

D'autre part, il n'y avait pas de différence significative entre les autres marqueurs TGMH et CCMH chez les lots traités par EEP(G5) ou HE.P(G3) par rapport au témoin.

L'analyse de l'indice de distribution corpusculaire a significativement augmenté de 1.08 % chez les rats intoxiqués par  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  par rapport au groupe témoin (12.56 %).

Par ailleurs, il y a eu une diminution significative de ces valeurs chez les rats traités par (HE.P+ Cu) 13.5 % et (EEP +Cu) 11.32 % comparés au groupe intoxiqué par Cu, et de même pour les groupes G5 (11.82%) et G3 (11.77%).

Les résultats de la présente étude indiquent que le nombre des globules blancs (GB) et lymphocytes étaient significativement faibles ( $P < 0,001$ ) chez les rats qui ont reçu les sulfate de cuivre (2160/  $\text{mm}^3$  et 49.8%) par rapport au groupe témoin (8230  $\text{mm}^3$  et 58.07 %). Tandis que, l'administration de HE.P ou EEP chez les groupes G4 et G6 intoxiqués au cuivre a montré respectivement une augmentation très hautement significative (44 % et 26%) et (65% et 18.5%) de ces valeurs par rapport au G2.

Le traitement des rats par le cuivre, EEP et HE.P a induit une augmentation très hautement significative du taux des granulocytes (39%, 41% et 38%) par rapport aux témoins. En revanche, une diminution du taux des monocytes a été constatée. Cette diminution a été remarquée aussi chez les groupes traités par l'huile essentielle (26 %) et l'extrait hydro-alcoolique (32 %) par rapport aux témoins (26.5 %). Tandis que les rats du groupe 6 (qui ont reçu 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP) ont montré une augmentation de 12 % par rapport au G2 (25.7%).

Les résultats de la numération plaquettaire ont également été présentés dans le tableau .33. Une diminution très hautement significative de  $443000 /\text{mm}^3$  a été constatée chez le groupe exposé au cuivre par rapport au groupe témoin ( $500000/\text{mm}^3$ ). Inversement, les groupes G3 et G5 ont montré une augmentation très hautement significative de ces valeurs ( $82000/\text{mm}^3$  et  $37000/\text{mm}^3$ ), respectivement par rapport au G1. Le traitement avec l'huile de *Petroselinum crispum* (G4) ou l'extrait hydro-alcoolique (G6) au rats intoxiqués au cuivre a induit aussi une augmentation très hautement significative du taux de plaquettes ( $292000 /\text{mm}^3$  et  $647000/\text{mm}^3$ ) comparativement au G2.

Le traitement des animaux par l'HE.P et EEP a significativement amélioré certains paramètres hématologiques par rapport aux animaux intoxiqués au Cu et non traités (tableau. 33).

**Tableau 33 :** Variation des paramètres hématologiques, chez les rats traités ou/non par (EEP) ; (HE.P) et de sulfate penta-hydraté de cuivre après 60 jours.

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6
<b>GR</b> ( $10^6 /\text{mm}^3$ )	6.01±0.0057	4.78±0.003***	7.75±0.0021***	6.88±0.004###	7.12±0.21***	6.99±0.21###
<b>Hb</b> (g/dl)	11.9±0.0308	8.72±0.006***	14.38±0.0061***	13.65±0.002###	13.78±0.21***	13.79±0.21###
<b>HT</b> (%)	34.36±0.006	28.08±2.64***	42.79±0.0021***	39.14±0.0087###	40.5±0.21***	39.89±0.21###
<b>VGM</b> (fL)	57.17±0.139	58.69±0.002*	55.18±0.0021*	56.89±0.0021#	56.86±2.19*	57.09±0.21#
<b>TGMH</b> (Pg)	19.81±0.003	18.23±0.009***	19.13±2.185	19.84±0.0087###	19.53±0.21	19.73±0.22###
<b>CCMH</b> (g/dl)	34.65±0.003	31.07±0.021***	34.66±2.183	34.86±0.0021###	34.02±0.87	34.57±0.22###
<b>IDR</b> (%)	12.52±0.008	13.6±0.048***	11.77±0.0021***	13.5±0.0218#	11.82±0.21*	11.32±0.21###
<b>GB</b> ( $/\text{mm}^3$ )	8230±5.773	2160±2.182***	8420±4.364***	3850±3.779###	6880±21.93***	6140±3.77###
<b>Lymphocytes (%)</b>	58.7±0.5	49.8±0.04***	56±0.61***	67.8 ± 0.069###	45.6±2.18**	61.1±2.19###

**Monocytes (%)**

26.5±0.003    25.7±0.048\*\*\*    19.7± 0.078\*\*\*    17± 0.487###    17.9 ± 0.218\*\*\*    29.1±0.219###

**Granulocytes (%)**

15± 3.450    24.7± 1.154\*\*\*    24.3± 1.234\*\*\*    15.2± 2.182###    25.3± 2.672\*\*\*    21± 3.779

**Neutrophiles(%)**

13.4 ± 0.123    21.1 ± 0.030\*\*\*    22.1 ± 0.0308\*\*\*    14.5± 0.154###    21.8 ± 0.219\*\*\*    19.6±0.219###

**Eosinophiles(%)**

1 ± 0.109    1.6 ± 0.061\*\*\*    1.8± 0.0617\*\*\*    0.3± 0.048###    3.2± 0.222    1.1±0.021###

**Basophiles (%)**

0.6±0.021    2± 0.308\*\*\*    0.4± 0.008    0.4 ± 0.061###    0.3 ± 0.0487    0.3 ± 0.0218###

**Plaquettes (/mm<sup>3</sup>)**

50000±4364.35    57000±285.71\*\*\*    582000±218.21\*\*\*    349000±218.21###    537000±2193.06\*\*\*    704000± 487.95 ###

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P <0.001, pour CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (G2) ; huile essentielle (G3) ; extrait de persil (G5) vs témoin (G1).

#P < 0.05, ##P <0.01, and ###P <0.001, intoxiqué groupe (G2) vs .

P : Seuil de signification.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

**Discussion**

Le cuivre, en tant qu'oligo-élément, contribue à plusieurs fonctions des enzymes impliquées dans les processus biologiques vitaux alors qu'à forte dose, il pourrait induire des effets néfastes dans les systèmes physiologiques (Babaei et al., 2012). Selon les résultats, l'analyse de l'hémogramme montre que l'administration de CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O provoquait des perturbations hématologiques par rapport aux témoins. Ces perturbations étaient marquées par une diminution importante des globules rouges, globules blancs (leucopénie), d'hémoglobine, d'hématocrite, de CCMH, de TGMH et des plaquettes (thrombopénie), et une augmentation de VGM et IDR. Cela a clairement révélé une anémie macrocytaire et une anisocytose causées par le Cu. Récemment, plusieurs travaux ont prouvé que l'exposition au cuivre peut déclencher une nécrose hépatique induisant une anémie hémolytique et des dommages aux membranes cellulaires des globules rouges (Mendel et al., 2007; Aboushouk ,2018). Le processus d'hémolyse est probablement due a l'inhibition de la glucose-6-phosphate

déshydrogénase et la diminution du taux de NADPH indispensable à la capacité de régénération de glutathion, augmentant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, ayant pour conséquence des dommages membranaires des globules rouges, de plus en présence de fortes concentrations de radicaux libre générés par le cuivre, l'hémoglobine peut facilement s'oxyder expliquant ainsi l'anémie hémolytique (Sarvu et al., 2007). En revanche, une diminution considérable du nombre de globules blancs (leucopénie) a été enregistrée chez les animaux intoxiqués par le cuivre principalement dû à une lympho-cytopenie et monocytopenie. Donc dans ce cas, le cuivre a exercé un effet immuno-suppresseur sur la production des globules blancs notamment des leucocytes de la lignée lymphoïde et les monocytes de la lignée myéloïde, cela a été confirmé par la baisse du taux de lymphocytes et monocytes du sang. Les résultats ont mis en évidence une diminution du taux des monocytes chez les rats intoxiqués au cuivre par rapport aux témoins et qui peut être expliquée soit par la migration des monocytes à partir du sang vers les tissus sous l'effet du  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ou par l'inhibition de la production des monocytes de la lignée myéloïde. Donc, le cuivre est cytotoxique pour les monocytes et les lymphocytes. Par contre, une augmentation du taux des monocytes chez les rats intoxiqués au cuivre et traités par EEP peut être dû à une induction de la production de la lignée myéloïde pour augmenter le nombre des phagocytes sous l'effet de l'extrait hydro-alcoolique. Concernant les lymphocytes, une diminution du taux de ces cellules a été enregistrée chez les rats traités par le sulfate de cuivre penta-hydraté par rapport au témoin (G1). Cela pourrait être expliqué d'une part, par la migration de ces cellules vers les organes telle que la rate, le foie, les reins, d'où il a été enregistré une hypertrophie de ces organes, et d'autre part, par l'inhibition de la production de la lignée lymphoïde sous l'effet du traitement par le cuivre. Selon Al-Naimi et al. (2013), la diminution des lymphocytes (lymphopénie) chez les rats traités par le cuivre est dû à leur migration du système circulatoire vers les tissus lésés, en particulier le foie, les reins et les poumons, dans lesquels ils adhèrent à l'endothélium et immigrent vers les zones péri-vasculaires. Alors que la thrombopénie résulte de l'empoisonnement au cuivre qui provoque une interférence avec la coagulation et hémorragie. L'augmentation des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) chez les rats traités par cuivre peut être expliquée par une induction de la différenciation des pro-géniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse qui donnent naissance aux cellules polynucléaires. Probablement, cela a été dû à l'existence d'une réaction inflammatoire quelque part dans l'organisme des animaux traités par le cuivre. Cela a été également prouvé par l'existence d'un infiltrat inflammatoire aux niveaux des coupes histologiques des organes (foie, reins, cerveau et rate) ainsi qu'une augmentation de leurs

poinds. Le traitement des animaux avec le cuivre a induit une thrombopénie qui pourrait être d'origine toxique expliquée par le fait que le cuivre affectait la production de cellules de la moelle osseuse, agissant directement sur les précurseurs plaquettaires, ou bien il entraînait une diminution des plaquettes déjà formées (par dégradation, séquestration, perte ou consommation). Cette diminution en nombre des plaquettes peut entraîner un risque hémorragique (Mairif Samah ,2015). Dans cette étude, la supplémentation de persil a montré une amélioration significative des paramètres hématologiques en réduisant les effets toxiques de cuivre. Cette amélioration résultant des traitements peut s'expliquer par le fait que le persil est une bonne source de minéraux (Fe, Mg, P, K, Ca, Na et Zn), bêta-carotène, vitamine (A, C, riboflavine, la niacine et B12), en chlorophylle et en acides gras utile pour améliorer l'état de santé général et renforcer l'immunité(Ragab et *al.*, 2010 ; Osman et ses collaborateurs., 2004 ;Hassan et *al.*, 2004 ; El-barbary , 2009) . L'effet préventif de persil est certainement dû à sa composition riche en phénylpropanoïdes, caroténoïdes, flavonoïdes, différents composés terpéniques, manganèse , calcium, potassium , soufre , polyphénols et vitamine C (Ragab et *al.*, 2010 ; Trifunski et Ardelean ,2012 ; Kaur et Kapoor, 2002 ; Reyhaneh, 2012) , et par la chélation et l'excrétion des métaux lourds de l'organisme (Darias et *al.*, 2001 . ; Heidari et *al.*, 2018) .Ces résultats concordant avec plusieurs travaux (Rashwan, 2009 ; Kolarovic et *al.* , 2007 ; Gadi et *al.*,2009 ; Zhang et *al.*, 2006 ; Al-Daraji ,2012 ; Trifunski et Ardelean ,2012 ) qui suggèraient que le persil augmentait le nombre de érythrocytes, les globules blancs , le taux moyen du volume globulaire (VGM), la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH) , la concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH), le taux de l'hémoglobine et thrombocytes, en raison des activités potentielles des composés antioxydants, tel que myristicine , apiol , limonène, bêta-carotène et coumarine dans le piégeage des espèces réactives d'oxygène (ROS) ou radicaux libres générés par le stress oxydatif induit par la toxicité du Cu.En effet, le persil participe au renouvellement et la production des globules rouges parce qu'il est riche en vitamine C qui facilite l'absorption du fer (Duke et *al.* ,2009). Les résultats de Bahnas et *al.* (2009) ont montré que le persil est un excellent remède pour rétablir la digestion. Il améliore la digestion des protéines et des graisses, favorisant ainsi l'absorption intestinale, l'assimilation par le foie et le stockage. En raison de sa teneur élevée en enzymes, le persil favorise l'activité et l'élimination digestive.

Nielsen et ses collaborateurs. (1999) ont signalé que l'utilisation de l'huile essentielle de persil a entraîné une augmentation des niveaux de glutathion réductase et de superoxyde dismutase et de l'activité anti-oxydante totale. Ainsi, La GSH-Px joue un rôle important dans la

détoxification des composés xénobiotiques et dans l'anti-oxydation des ROS (Yagmurca et al., 2004). Les composés chlorés du persil présentent souvent des activités biologiques importantes, par exemple des activités anti-oxydantes antibiotiques, anti-tumorales, antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires, anti-hépatotoxiques et pesticides qui reflètent toutes une amélioration de l'état de santé général de l'organisme (Holst et Engvild, 2000 ; Kery et coll., 2001 ; Al-Howiriny et coll., 2003). En plus, une augmentation considérable des lymphocytes a été enregistrée chez les animaux traités par l'extrait ou l'huile essentielle en combinaison avec le Cu. Ce nombre élevé des lymphocytes indiquait que l'organisme lutte contre les dommages causés par la présence de ce xénobiotique dans l'organisme. Ce qui confirme l'importance des lymphocytes dans la défense immunitaire contre les substances toxiques telles que le Cu. On peut conclure que le traitement par l'EEP ou HE.P a assuré un effet régulateur des paramètres hématologiques contre l'action néfaste du Cu.

#### **IV.4.2.2. 3. Influence du traitement sur les variations du poids corporel et pondérales des organes**

##### **Résultats**

L'influence du traitement sur l'évolution du poids corporel des rats a été présentée dans la fig. 37. Aucune mortalité n'a été enregistrée durant la période d'expérimentation. Le sulfate de cuivre a entraîné une diminution très hautement significative du poids corporel des animaux (G2) par rapport aux rats témoins normaux (G1).

En revanche, les animaux traités simultanément avec HE.P et  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (G4); EEP et  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (G6) ont présenté une augmentation très hautement significative de leur poids corporel par rapport aux rats du groupe 2 (ayant reçu 2000 ppm de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Par contre, une diminution importante a été observée chez les rats des groupes 3 et 5 par rapport aux animaux témoins.

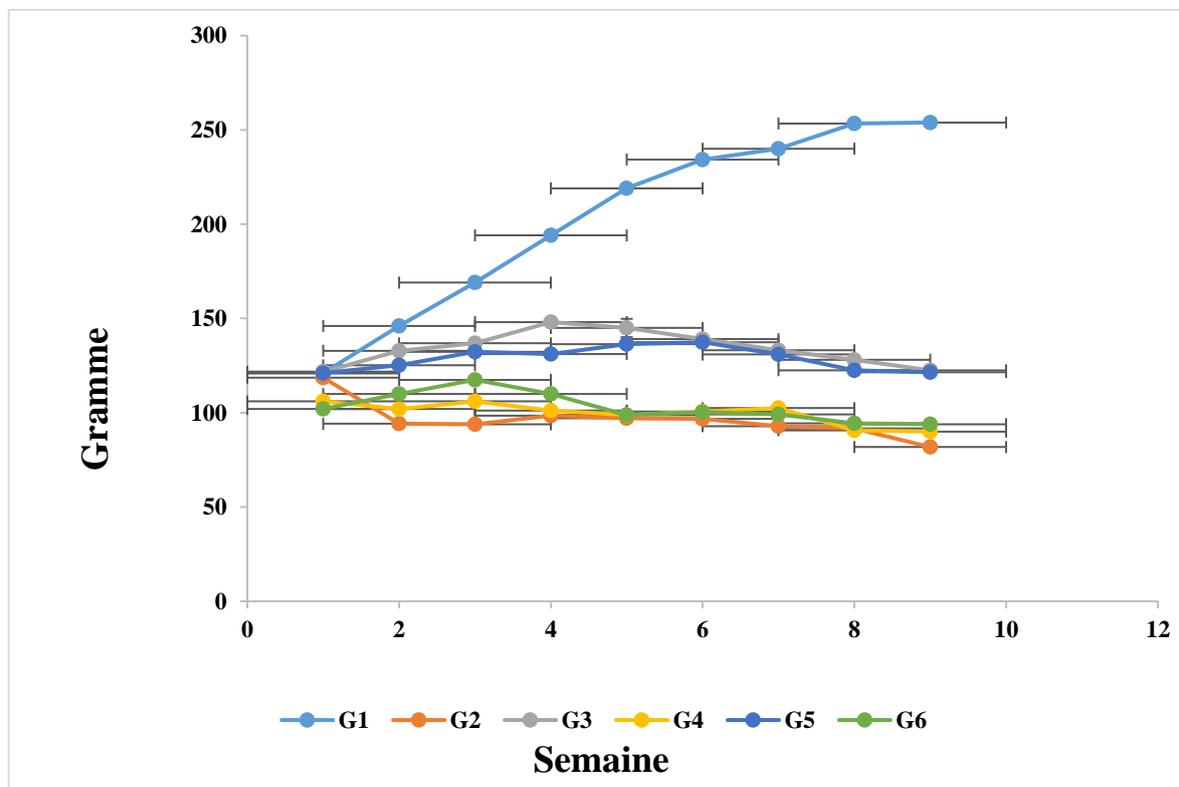
Une très lente croissance et une diminution du poids final ont été remarquées pour tous les groupes traités (G2, G3, G4, G5, G6) par rapport au groupe témoin (G1).

Les résultats, aperçus chez les rats intoxiqués au Cu, montraient une augmentation très importante du poids relatif des tissus cibles à savoir ; cerveau, foie, reins et rate par rapport au groupe témoin. En revanche, l'administration par voie orale des extraits HE.P ou EEP seuls ou en combinaison avec  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a induit une chute du poids relatif du foie, des reins et du tissu splénique par rapport aux rats du groupe 2.

En outre, les poids relatifs de foie, reins, cerveau et rate ont connu une augmentation chez les rats traités par le Cu par rapport aux témoins. Cette augmentation a été due à une hypertrophie de foie (hépatomégalie), reins, cerveau et la rate (splénomégalie), résultats déjà confirmés par l'étude histologique.

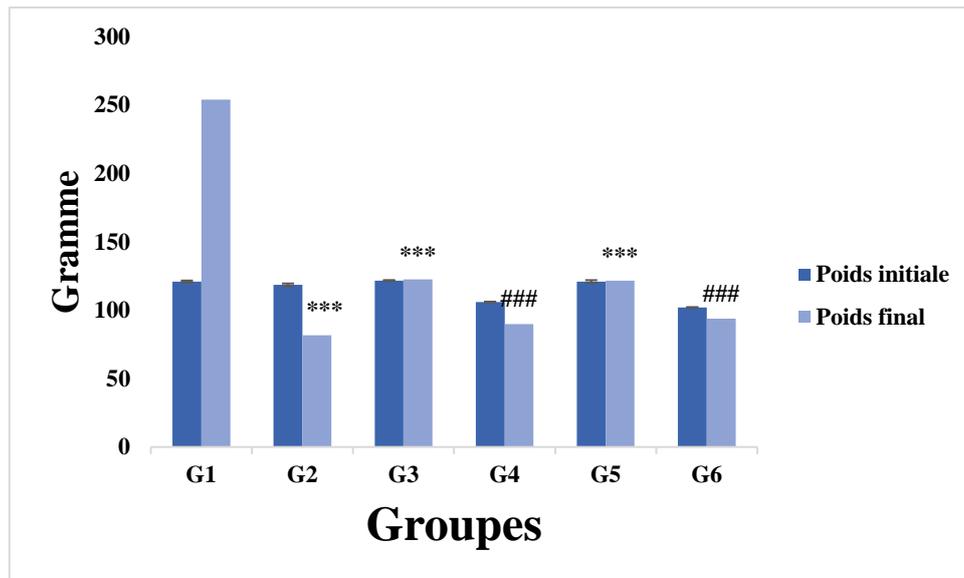
L'augmentation du poids relatifs des organes (foie, reins, cerveau et rate) chez les rats traitée seulement par HE.P ou EEP par rapport aux rats témoins a été due certainement à la diminution de leurs poids corporel. L'étude histologique n'a révélé aucune altération chez ces groupes (G 3 et G5).

Par contre chez les rats traités par HE.P (G4) ou EEP (G6) une diminution du poids relatif de ces organes a été observée par rapport aux rats exposés au Cu.



**Figure 37 :** Variation des poids chez les groupes témoin et traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après une période de 60 jours d'expérimentation.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP .



**Figure 38 :** Variation des poids initial et final chez les groupes témoin et traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP

**Tableau 34:** Variation des poids final relatifs au control et taux de croissance chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement.

Paramètre	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Taux de croissance	132.92	-36.83	0.77	-15.98	0.5	-8.08
Poids final relatif au control %	100	32.20	48.24	35.44	47.85	36.97

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

**Tableau 35 :** Variation des poids relatifs du cerveau, foie, des reins et de la rate chez le lot témoin et les lots traités ou /non par le Cu, HE.P et/ou EEP après 60 jours de traitement

<b>Poids (g)</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
<b>Cerveau</b>						
Poids Absolu	1.07	1.35	1.39	1.30	1.15	1.29
Poids Relatif	4.24	16.51	11.40	16.25	10.67	13.71
<b>Foie</b>						
Poids Absolu	4.27	6.24	6.13	6.13	4.94	5.94
Poids Relatif	16.84	76.38	51.57	76.25	45.69	63.33
<b>Reins</b>						
Poids Absolu	0.50	0.89	0.79	0.68	0.69	0.68
Poids Relatif	1.98	10.88	6.44	8.53	6.39	7.29
<b>Rate</b>						
Poids Absolu	0.38	0.65	0.48	0.45	0.37	0.55
Poids Relatif	1.49	7.97	3.99	5.66	3.47	5.88

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

## **Discussion**

Dans la présente étude, l'administration de Cu a montré une perte de poids très significative. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Mohammed et *al.* 2014 et Al-Naimi et *al.* 2013. Cette réduction du poids pourrait être causée par une perturbation du métabolisme probablement due à une entérite ulcéreuse de la toxicité du Cu. En effet, le Cuivre est un irritant oxydant pour la muqueuse intestinale.

En outre, une diminution du poids des animaux traités avec le persil a été constatée. Cette diminution du poids pourrait résulter des effets diurétiques, hypoglycémiques et laxatifs de cette plante médicinale (Darias et *al.*, 2001 ; Yanardag et *al.*, 2003 ; Kreydiyyeh et *al.* , 2001). Une étude récente a suggéré une diminution significative du poids des fœtus de rats albinos âgés de un à sept jours traités avec 2 mg de l'étoricoxib et 0.5 mg de l'huile de *Petroselinum crispum* selon Al-Ghamdi et Abeer (2016).

De même, Rezazade et Farokhi (2014) ont suggéré une diminution significative du poids chez les rates gestantes traités avec l'extrait hydro-éthanolique de persil par rapport au groupe témoin.

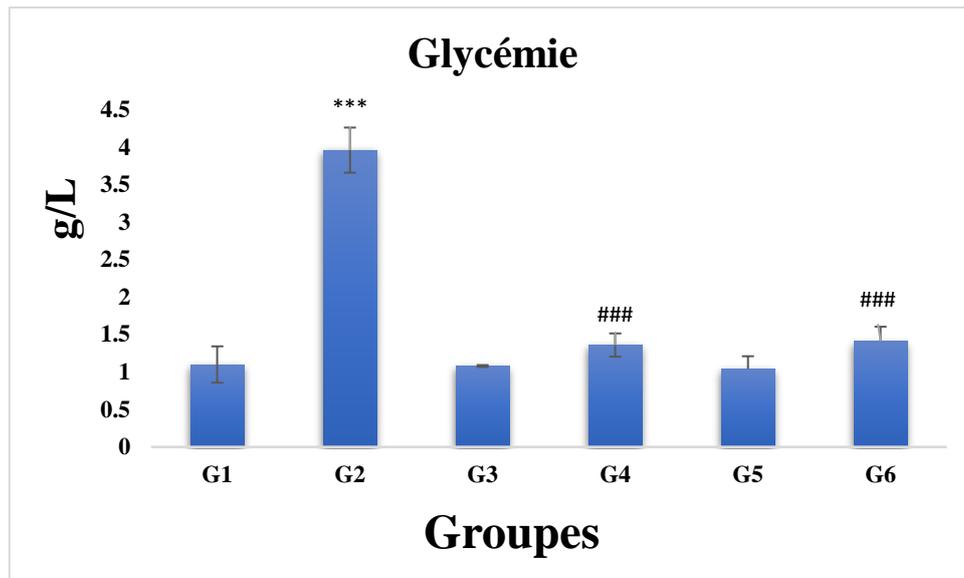
En revanche, malgré l'administration de cuivre aux rats du G4 et G6, il a été enregistré un taux de croissance supérieur à celui des animaux de G2 (tableau. 34), ceci probablement a été dû à l'effet protecteur du *Petroselinum crispum*.

### **IV.4.2.2.4. Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques**

#### **Glycémie**

Les résultats de cette présente étude, ont montré une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de 72 % du taux de la glycémie chez les rats du G2 traités par le cuivre (2000 ppm) par rapport aux rats du groupe témoin (G1). En revanche, des diminutions de 65 % et 64% ont été enregistrées, respectivement chez les rats du G4 et G6 par rapport aux rats du groupe 2 (qui ont reçu uniquement le cuivre).

Aucune différence significative n'a été remarquée chez les animaux des groupes 3 et 5 par rapport aux témoins (fig. 39).



**Figure 39 :** Glycémie (g/L) chez les groupes témoin et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

Un excès de cuivre peut créer un stress oxydatif, ce qui est un facteur dans l'apparition et la progression du diabète sucré de type 2. Un métabolisme anormal du Cu semble accompagner et peut aussi causer des complications du diabète (Atari-Hajjipirloo et *al.*, 2016).

De plus, les ions de cuivre dans le sang peuvent augmenter le taux de formation du produit final glycosylé avancé, ce qui est associé à la pathogénicité des complications secondaires du diabète. La concentration de cuivre dans le plasma sanguin est également élevée chez les patients diabétiques que chez les non-diabétiques. Elle peut entraîner l'hypertension, la rétinopathie et des maladies micro-vasculaires (Uriu-Adams et Keen, 2005).

En outre, des études sur l'excrétion urinaire de cuivre ont montré une quantité excessive de cuivre libre chélatable chez les patients diabétiques (Ito et *al.*, 2001 ; Cooper et *al.*, 2005).

Le taux de glucose sanguin était significativement très élevé ( $p < 0.001$ ) chez les rats qui avaient reçu uniquement le cuivre (G2) par rapport au groupe témoin (G1). Tandis que, l'administration de HE.P ou EEP chez les groupes G4 et G6 respectivement, a montré une diminution de la glycémie par rapport au G2.

En revanche, l'administration de HE.P ou EEP chez les groupes G3 et G5 a montré une glycémie normale avec une concentration de 1.08 g/L et 1.04 g/L, respectivement (fig. 39).

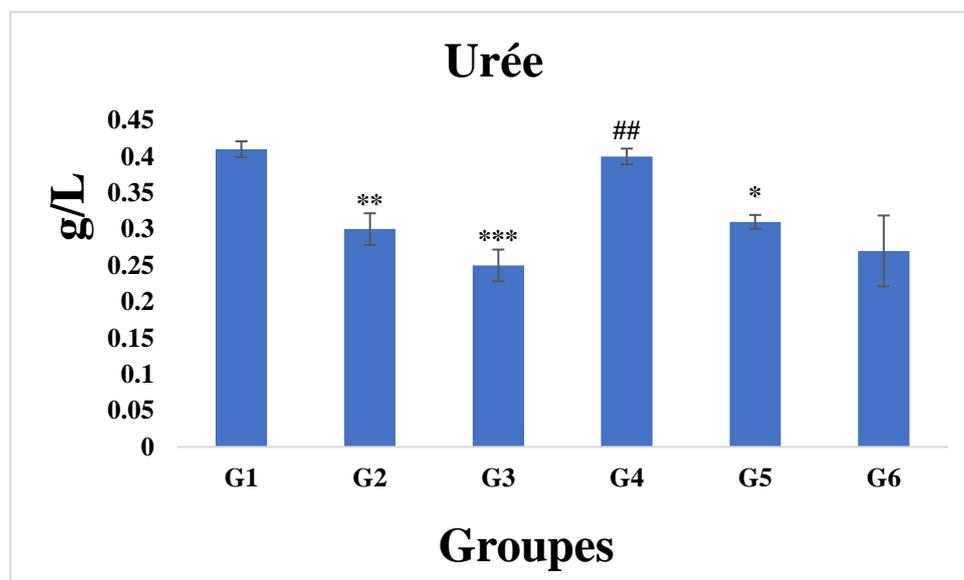
Ce résultat est similaire à celui rapporté par Ozsoy-Sacan et al. (2006) qui ont montré que l'extrait de persil à la dose 2 g / kg exerce un effet semblable à la glibornuride sur le diabète de type 2 induit par la streptozotocine.

Les effets antidiabétiques de *Petroselinum crispum* viennent en partie du fait de son activité anti-oxydante et de son mécanisme d'action qui impliquait l'inhibition du la gluconéogenèse et la stimulation de la glycolyse. En effet, plusieurs tests *in vivo* ont montré que le persil est capable de normaliser le taux de glucose dans le sang (Agyare et al., 2017 ; Bolkent et al., 2004 ; Ozsoy-Sacan et al., 2006 ; Khaled et al., 2019 ; Mahmood et al., 2014 ). L'effet préventif et hypoglycémiant de *Petroselinum crispum* est certainement dû à sa composition riche en terpénoïdes, flavonoïdes, coumarines et acide ascorbique.

### Urée

Les rats traités avec EEP et HE.P (G3 et G5) ont montré, respectivement une diminution de 39% et 24% du taux d'urée par rapport au groupe G1.

En comparaison avec le groupe intoxiqué au cuivre (un taux d'urée de 0.3 g), le groupe G4 (une mixture de HE.P et CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O) a montré une diminution moins importante de l'urémie à 0.01 g/L par rapport au G1 . En revanche, les rats administrés avec une mixture d'EEP et CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (G6) ont montré une légère diminution de 0.03 g/L par rapport au G2 (fig.40).



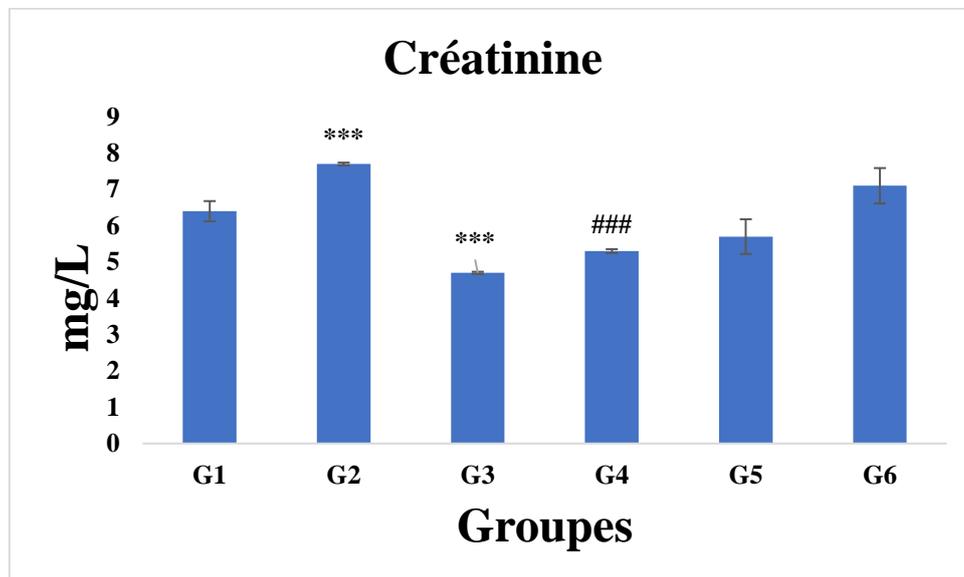
**Figure 40 :** Concentration sérique de l'urée (g/L) chez les rats traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

## Créatininémie

L'administration de cuivre aux rats du groupe 2 a causé une augmentation très élevée du taux de créatinine (7.7 mg/L) comparés aux animaux du groupe témoin (G1) (6.4 mg/L) (fig.41). En revanche, l'administration d' EEP et HE.P, a réduit respectivement ce taux chez les rats du groupe G3 et G5 (4.7et 5.7 mg/L) par rapport au groupe G1.

Tandis que, le traitement par l'EEP et HE.P aux rats intoxiqués au cuivre a montré une diminution très hautement significative (5.3 et 7.1 mg/L), respectivement par rapport au G2.



**Figure 41 :** Concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

## Cholestérol

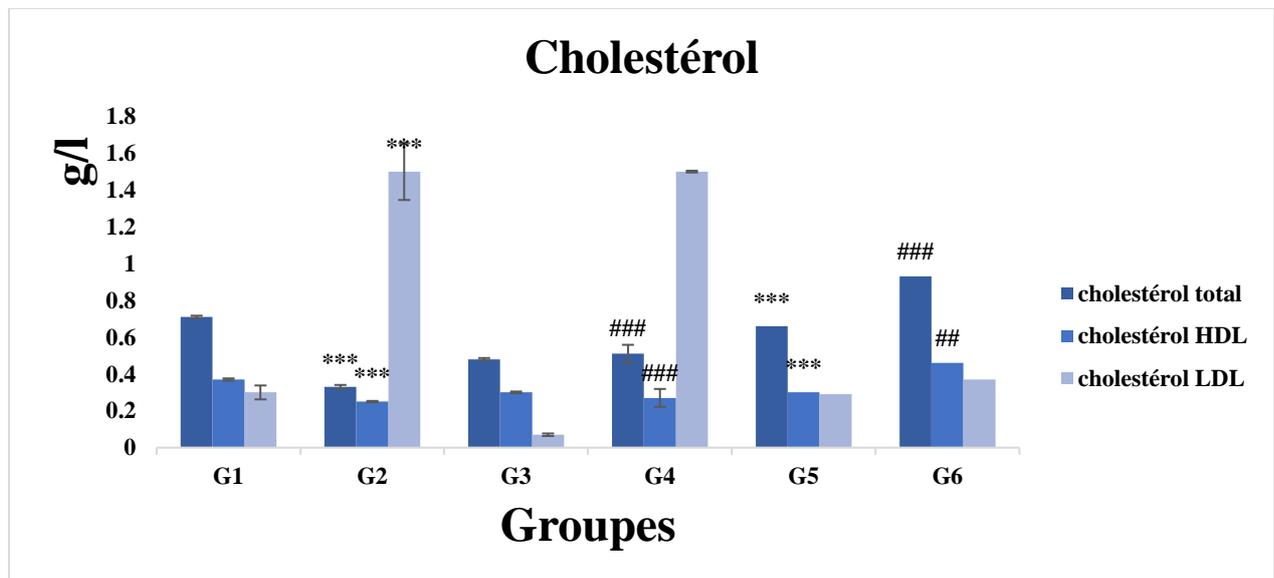
Les résultats de la présente étude , indiquent que les taux de cholestérol total , HDL et LDL étaient significativement réduits avec des pourcentages respectifs de 32 % , 19 % et 76 % chez les rats exposés uniquement à HE.P (G3) par rapport au témoin G1 (0.71g/l , 0.37 g/l et 0.3 g/l).

De même, une réduction des taux de cholestérol total, HDL et LDL a été observée respectivement chez le groupe G5 (0.05g/l , 0.07g/l et 0.01g/l ) par rapport au G1 . En outre,

une diminution de taux de cholestérol total et HDL de 0.38 g/l et 0.12 g/l a été observée, chez les rats du G2 comparativement aux témoins (G1).

Un taux très élevé du LDL a été observé chez les rats du groupes G2 et G4 (1.5 g/l) par rapport au groupe témoin G1.

En comparaison avec le taux du cholestérol total et HDL chez les rats du groupe G2, les rats des groupes G4 et G6 ont montré un taux élevé de (0.18 g/l et 0.02 g/l) et (0.6 g/l et 0.21 g/l) respectivement. En revanche, une importante diminution du taux de LDL chez le G6 (une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP) qui était de 1.13 g / l par rapport au G2 (fig. 42) .

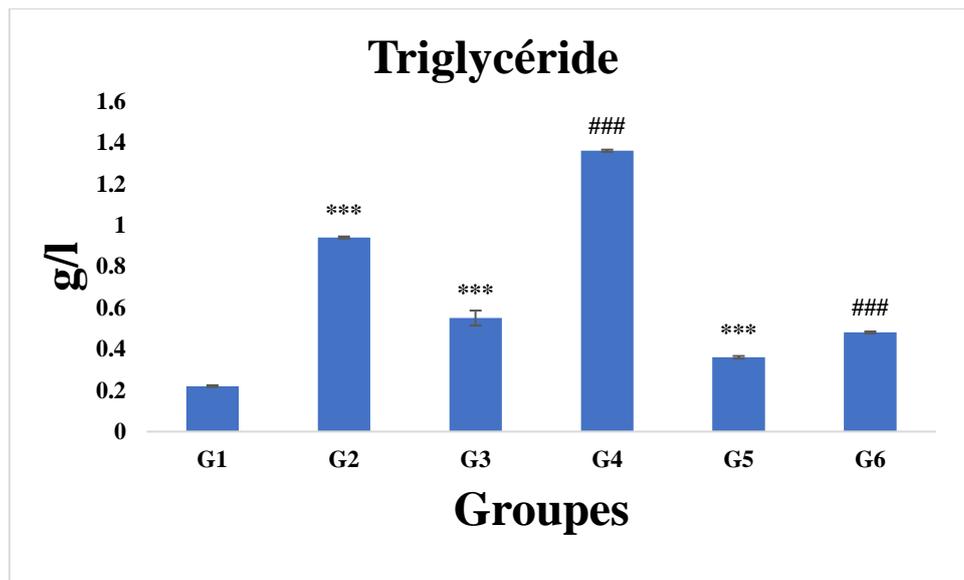


**Figure 42 :** Les teneurs sériques de cholestérol total, HDL et LDL (g/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/ Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP.

### Triglycéride

Les rats du groupe G2 , G3 et G5 traités uniquement par Cu , HE.P ou EEP respectivement , ont montré une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$  ) du taux des triglycérides respectifs de 0.94 g/l, 0.55 g/l et 0.36 g/l par rapport au G1 ( 0.22 g/l ) (fig. 43) . Tandis, que le groupe G4 a montré une importante augmentation de 0.42 g/l comparativement au groupe G2. En revanche, le groupe G6 a montré une diminution très hautement significative en triglycérides (0.46 g/l) par rapport au G2.



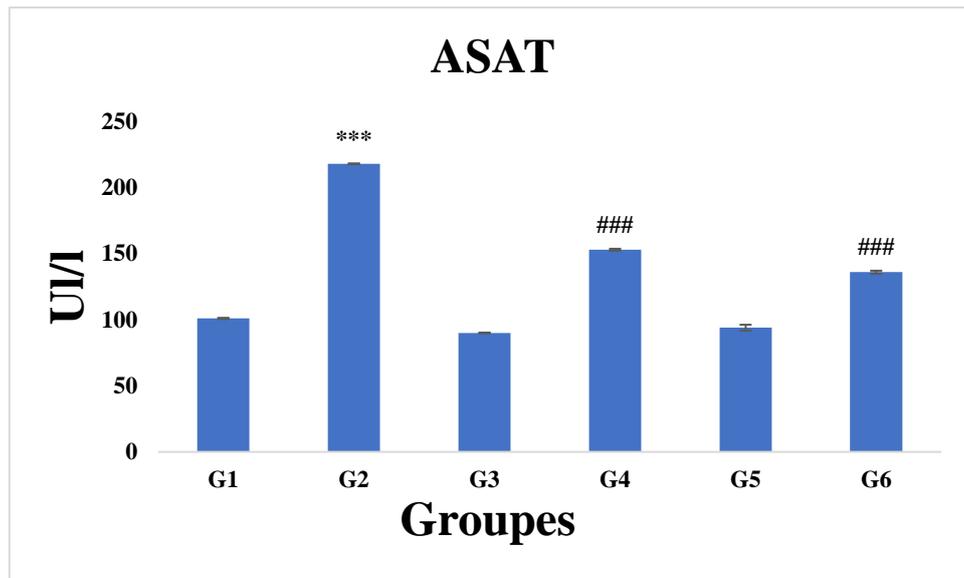
**Figure 43 :** Les teneurs sériques de triglycéride (g/l) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

### **Aspartate aminotransférase(ASAT)**

A la lumière de ces résultats, une augmentation de 53 % du taux sérique d'ASAT a été remarqué (218 ul/l) chez les rats du groupe G2 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) par rapport au groupe témoin G1 (101 UI/l) .

En revanche , une diminution de 11 % et 7 % du taux d'ASAT chez les rats du G3 et G5 respectifs (EEP et HE.P) par rapport au groupe G1. Tandis que le traitement des rats exposés au Cu avec EEP ou HE.P (G4 et G6) a engendré une diminution du taux de l'ASAT respectifs jusqu'à 29% et 37 % par rapport au groupe G2 (ayant reçu uniquement le cuivre) (fig. 44).



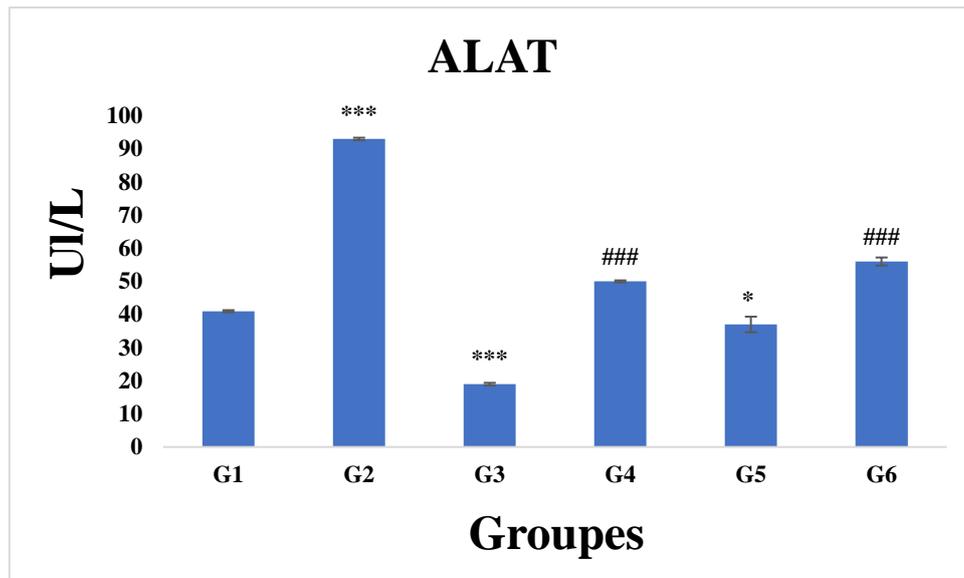
**Figure 44 :** Les teneurs sériques de l'aspartate aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 : 2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 : une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

### **Alanine aminotransférase(ALAT)**

D'après les résultats obtenus, il a été enregistré une augmentation de 56 % du taux sérique d'ALAT (93 UI/L) chez les rats G2 (cuivre) par rapport au groupe témoin G1 (41 UI/L) (fig. 45).

Le traitement uniquement d'EEP ou HE.P a induit une diminution significative de 53% et 10 % de l'activité de cette enzyme (ALAT), respectivement chez les rats du G3 et G5, par rapport au G1. En revanche, il a été remarqué une diminution de 47 % et 40 % chez les rats traités avec EEP et HE.P en combinaison avec le sulfate de cuivre par rapport au G2.



**Figure 45 :** Les teneurs sériques de l'alanine aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre.

G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; G4 : une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP.

### **Bilirubine**

Le taux de la bilirubine totale, direct ou indirect a été présenté par la figure 46 , chez les animaux traités ou non par le cuivre, EEP ou HE.P.

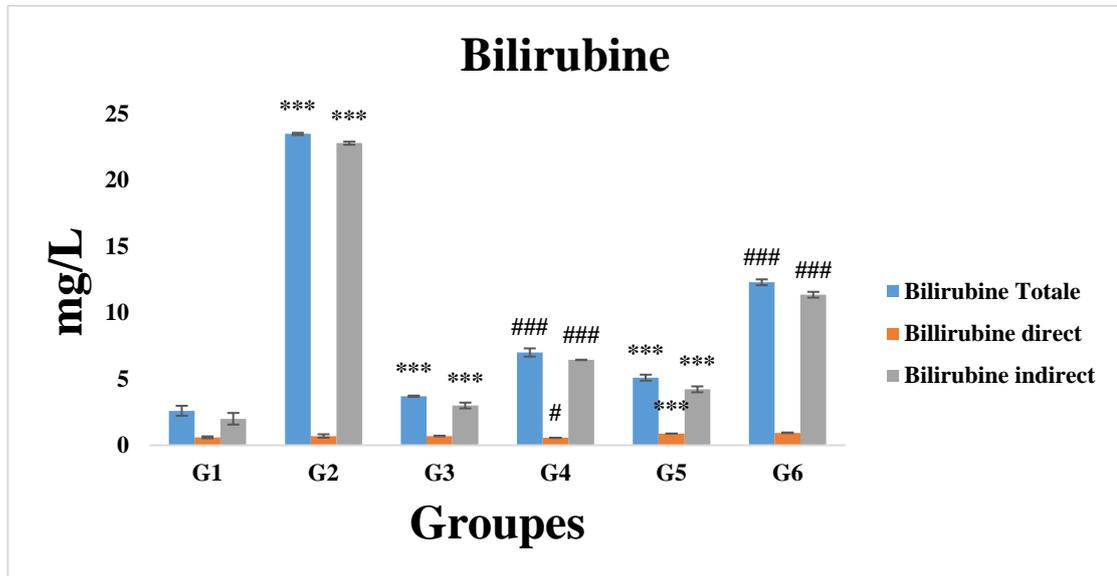
Le dosage du taux sérique de bilirubine totale, direct ou indirect a montré une augmentation très hautement significative chez les rats qui avaient reçu uniquement le sulfate de cuivre (G2) de l'ordre de 23.5, 0.7 et 22.8 mg/l respectivement par rapport au groupe témoin G1 (2.6, 0.6 et 2 mg/l).

En comparaison avec le groupe témoin, le traitement uniquement avec EEP ou HE.P a légèrement augmenté le taux de la bilirubine totale, direct ou indirect chez les rats du groupe 3 et 5 (1.1, 0.1, 1 et 2.5, 0.28, 2.22 mg/L) respectivement.

Il a été observé une diminution hautement significative du taux de bilirubine totale et indirect chez les rats du groupe G4 (16.5, 16.36 mg/L) et G6 (11.2, 11.44 mg/L), qui ont reçu,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + (HE.P) et de 2000 ppm de sulfate de cuivre + 2 g/Kg d' EEP respectivement, (pendant 60 jours) par rapport aux rats du groupe G2.

Le groupe traité par HE.P et  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (G4) a enregistré une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de bilirubine direct (0.56 mg/l) par rapport au G2. Par contre, l'administration de 2

g/Kg de EEP aux rats préalablement intoxiqués au cuivre a induit un taux élevé de la bilirubine direct (0.94 mg/L) par rapport au groupe G2 (fig. 46).



**Figure 46 :** Les taux de bilirubine totale, direct et indirect (g/L) chez les rats témoins et traités ou/non par l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P), d'extrait de persil (EEP) et/ou le cuivre. G1 : Témoin ; G2 :2000 ppm de sulfate de cuivre ; G3 : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P); G4 : une mixture de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et (HE.P) ; G5 : 2 g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; G6 :une mixture de 2000 ppm de sulfate de cuivre et 2 g/Kg de EEP.

#### IV.4.2.2.5. Etude histologique

##### Etude histologique du foie

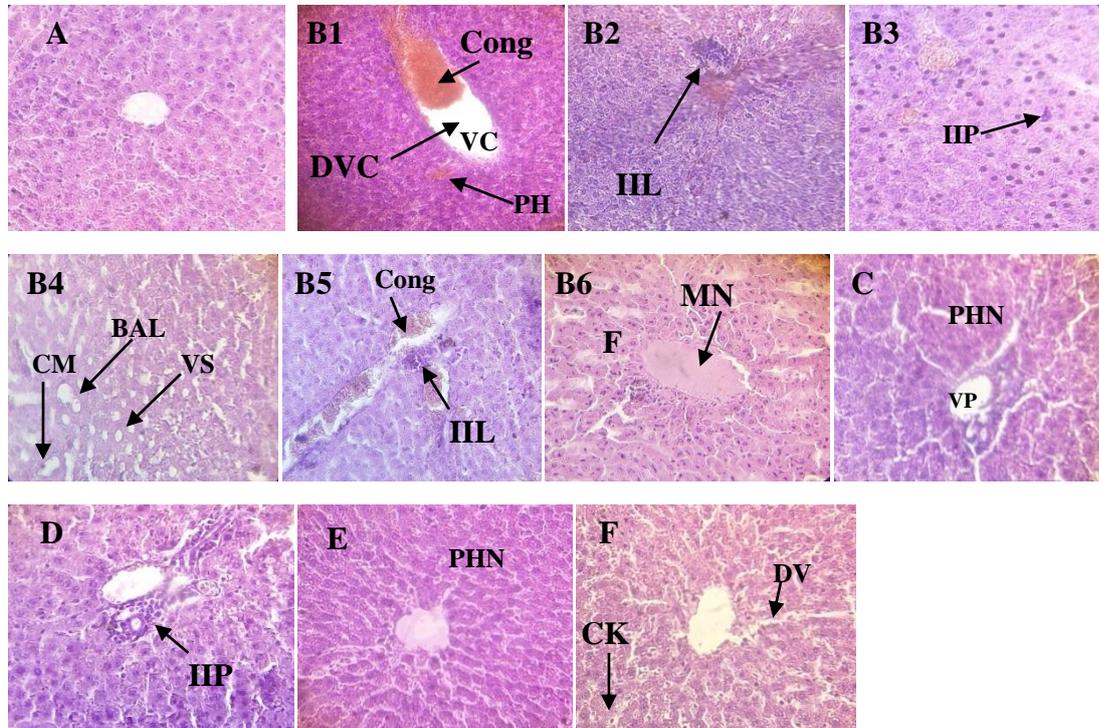
L'étude histologique du foie des rats du groupe témoin (G1) a montré une architecture normale du parenchyme hépatique, hépatocytes et veines Centro lobulaire (fig. 47 A).

Le groupe (G2) a engendré des altérations majeures dans le foie. Le cuivre a induit une cirrhose, une stéatose, un infiltrat inflammatoire lymphocytaire et plasmocytaire associé à une congestion des veines centro-lobulaire et hépatocytes irréguliers ballonnés avec la présence de corps de Mallory (fig. 47 B1-B2-B3-B4-B5-B6).

Par contre chez les groupes 3 et 5, il a été observé une architecture tissulaire et une organisation cellulaire similaires à celles observées chez les animaux du groupe témoin (fig. 47 C-E).

Le traitement avec 0.42 ml/kg de HE.P chez les rats du groupe 4 a montré un parenchyme hépatique très conservé avec une infiltration plasmocytaire et une absence totale de cirrhose ou stéatose (fig. 47 D).

Tandis que, l'administration de 2 g/Kg d'EEP aux rats du G6 a montré une dilatation des vaisseaux sanguins et même la présence des cellules de kupffer (fig. 47 F).



**Figure 47 :** Coupes histologiques de foie des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre ; C : 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F:une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

Cong : congestion ; VC : veine centro-lobulaire ; DVC : dilatation centro lobulaire ; PH: plage hémorragique; IIL : infiltrats inflammatoire lymphocytaire ; IIP: infiltrats inflammatoire plasmocytaire;BAL : ballonnement cellulaire ; CM :corps de mallory ; VS: vacuole de stéatose ;MN: macronodule ;VP: veine porte ;PHN : parenchyme hépatique normale ; DV : dilatation des vaisseaux sanguins ; CK: cellules de kupffer .

### Etude histologique des reins

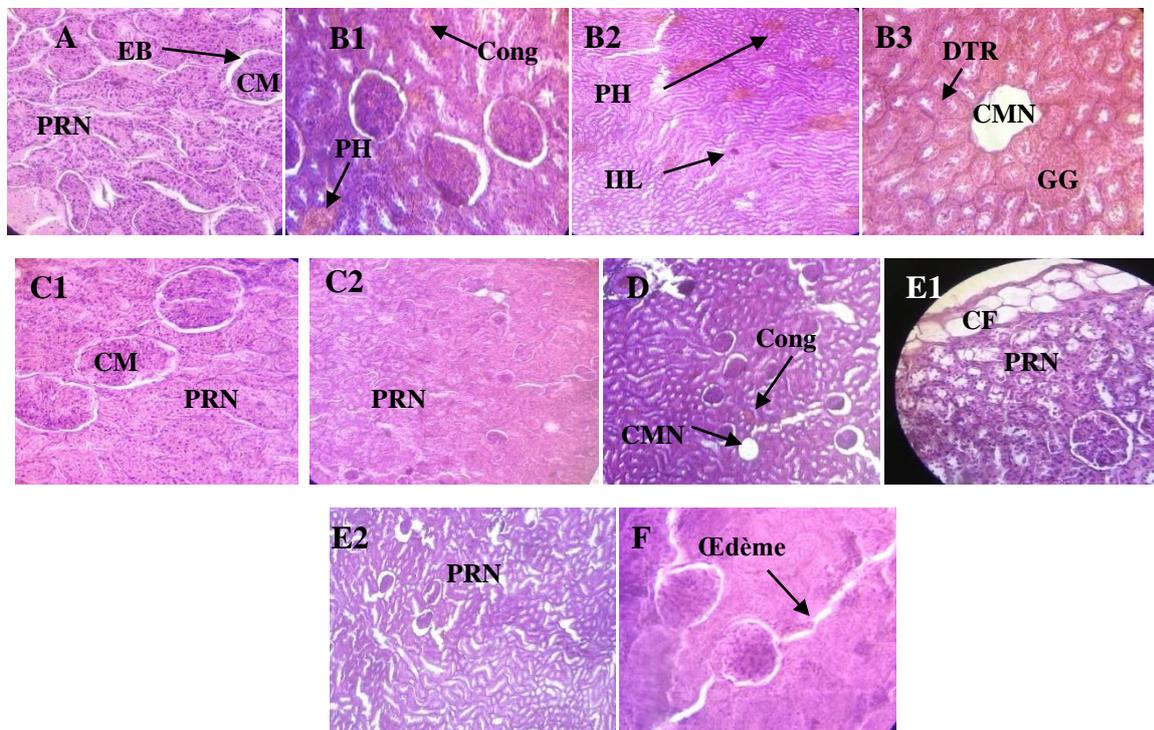
Le groupe témoin (G1) a montré une structure histologique normale du cortex rénale (fig .48 A).

L'observation microscopique des coupes histologiques des reins des rats du groupe G2 (2000 ppm de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a révélé la présence d'une congestion des tubules contournés proximaux très importante avec des plages hémorragiques, infiltrats inflammatoire lymphocytaire, des glomérules indéfinis et gonflés avec disparition de la capsule de browman et dilatation des tubules rénaux (fig. 48 B1-B2-B3).

L'administration uniquement de HE.P ou EEP aux rats des groupes 3 et 4, a respectivement montré une architecture normale avec une distribution des cellules régulières dont les corpuscules de Malpighi et les tubes rénaux étaient conservés, absence de congestions et hémorragie (fig. 48 C1-C2-E1-E2).

Une légère congestion capillaire au niveau du parenchyme rénal, glomérule indéfini ont été observés chez les rats du groupe G4 qui ont reçu une mixture de 0.42 ml/kg d'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) et 2000 ppm de sulfate de cuivre (fig.48 D).

Le traitement avec EEP chez le groupe G6 a montré un œdème dans le parenchyme rénal qui présentait une forme aigue dans la néphrite interstitielle (fig.48F).



**Figure 48 :** Coupes histologiques des reins des rats du groupe : A : Témoin ; B: 2000 ppm de sulfate de cuivre; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F:une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

Cong : congestion ; TR : tubules rénaux ; PRN : parenchyme rénale normale ; PH: plage hémorragique; CM:corpuscule rénal de Malpighi ou glomérule ;EB : capsule de browman ; GG : glomérule gonflé ; DTR : dilatation des tubules rénaux ; IILP : infiltrats inflammatoire lymphocytaire et plasmocytaire ;CMN : corpuscule rénal de Malpighi non défini ; CF : capsule fibreuse .

## **Etude histologique de cerveau**

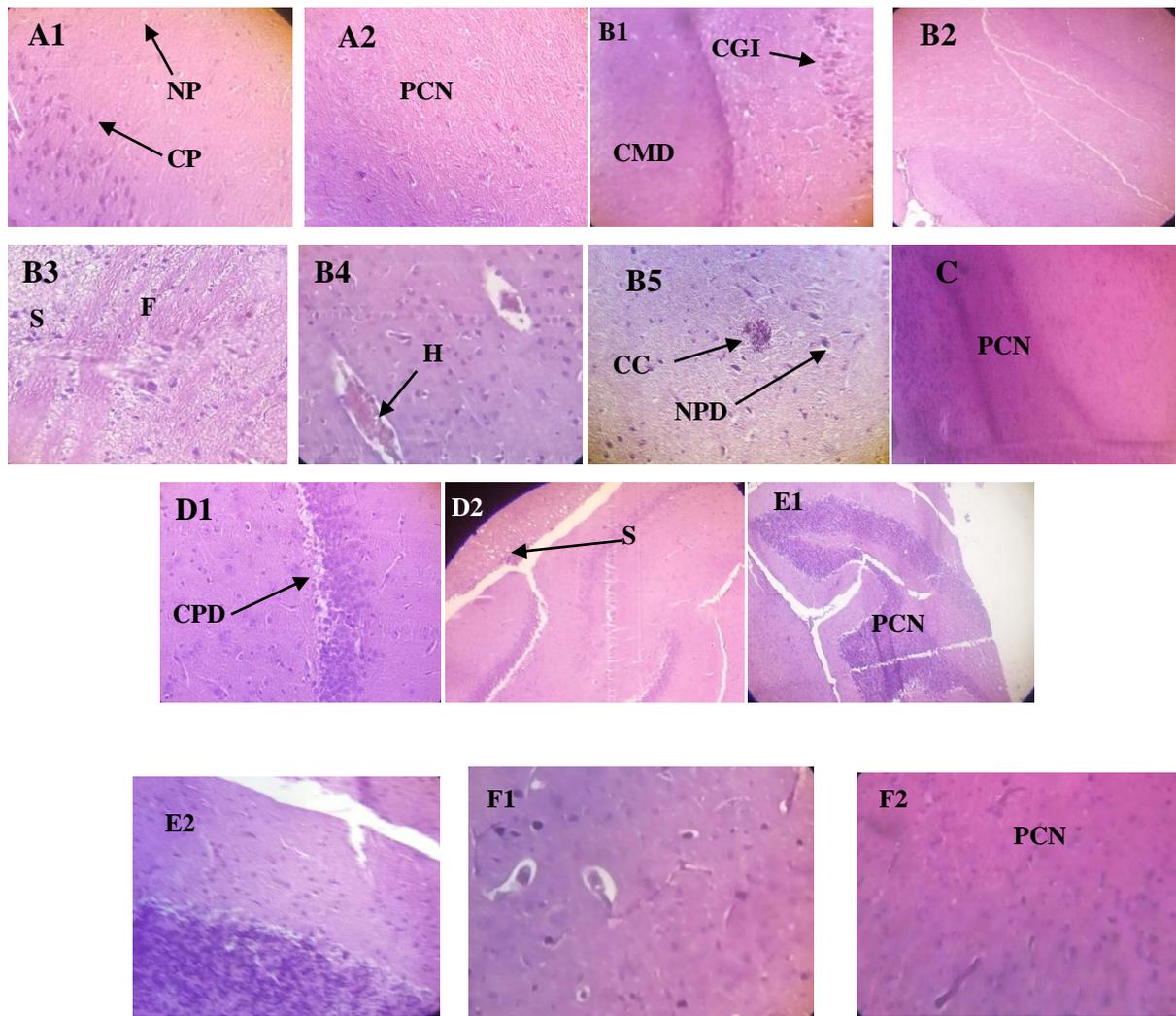
### **Résultats**

L'histologie du cerveau des rats du lot témoin (fig. 49 A1-A2) montre un cortex cérébral normal.

Par contre, l'administration de 2000 ppm de sulfate de cuivre a provoqué une altération structurale au niveau du cortex cérébral associée à une spongiose de la couche moléculaire et fibreuse induisant la mort neuronale et encore un carcinome cérébral .Les coupes histologiques montraient une hémorragie avec dégénérescence des neurones pyramidaux (fig.49 B1-B2-B3-B4-B5).

Tandis que, le traitement avec HE.P ou EEP aux rats du G3, G5 et G6, a permis la préservation de l'architecture cérébrale similaire à celle des animaux du groupe témoin (G1) (fig. 49 C-E1-E2-F1-F2) .

L'administration d'une combinaison de HE.P et le cuivre (groupe 4) a engendré une spongiose avec neurones pyramidales dégénérés (fig. 49 D1-D2).



**Figure 49 :** Coupes histologiques de cerveau des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre ; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F: une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.

NP: neurone pyramidale ; CP: cellule de purkinje ; PCN : parenchyme cérébrale normale ; CGI: couche granulaire interne ; CMD : couche moléculaire dégénérée; S : spongiose ; F: fibrose ; H: hémorragie; NPP: neurone pyramidale dégénéré , CPD : cellule de purkinje dégénérée ;CC:carcinome cérébral .

### Discussion

Les rats du groupe G2 intoxiqué par le cuivre sont atteints de maladie de prion et cancer cérébral.

Les altérations de la concentration des oligo-éléments ont un effet néfaste sur le métabolisme cellulaire et peuvent donc induire une cancérogenèse. Le cuivre induit la production de ROS, le déséquilibre entre les ROS et les antioxydants peut entraîner des dommages directs à l'ADN, des mutations et le développement du cancer. De plus, il est

également suggéré que le cuivre provoque le cancer en induisant l'angiogenèse tumorale (Khoshdel et al., 2016).

Le cuivre a longtemps été associé à la formation d'une conformation de la protéine prion PrP<sup>Sc</sup> enrichie en feuillets  $\beta$  résistante à la protéase, qui a été considérée comme l'étape critique des maladies neuro-dégénératives à prions appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (Viles, 2012 ; Yen et al., 2016) .

Le traitement des rats avec l'huile essentielle de persil (HE.P) a considérablement réduit les dommages induits par le cuivre dans le tissu cérébral (fig.49 D1-D2). En revanche, l'administration de EEP chez les rats du G6 a empêché toute altération cérébral, une architecture similaire à celle observé chez les animaux du groupe témoin a été observé (fig.50 F1-F2).Cela peut être dû à l'effet important du persil dans l'excrétion des métaux lourds (Darias et al., 2001).

En effet, le persil protège les dommages de l'ADN dans les cellules normales 3T3-L1 et augmente l'expression de p53, p21/Cip1 et la cadherine-E, comme il inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses MCF-7 et Hep G2 par son action cytotoxique et anti-oxydante (Farshori et al., 2014 ; Kuan-Hsun et al., 2019 ; Tang et al., 2015) .

L'inhibition du processus tumoral due à des molécules cytotoxiques naturelles a été identifiée dans le persil, comme le flavone (apigénine), l'isoflavone (généistéine) et les huiles essentielles (apiol, myristicine et pinène), qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Mahmood et al., 2014 ; Bahare et al., 2019 ; Craft et Setzer, 2017 ; Tuli et al., 2019) .

Allam et al. (2016) ont montré que l'exposition des rats au cadmium a causé des altérations neuronales dans le cerveau. La supplémentation de 5 g/kg de persil améliore le comportement anormal des souris intoxiquées au Cd et réduit les changements délétères associés au traitement du Cd sur le comportement, le niveau des neurotransmetteurs, le stress oxydatif et les neurones cérébraux.

### **Etude histologique de la rate**

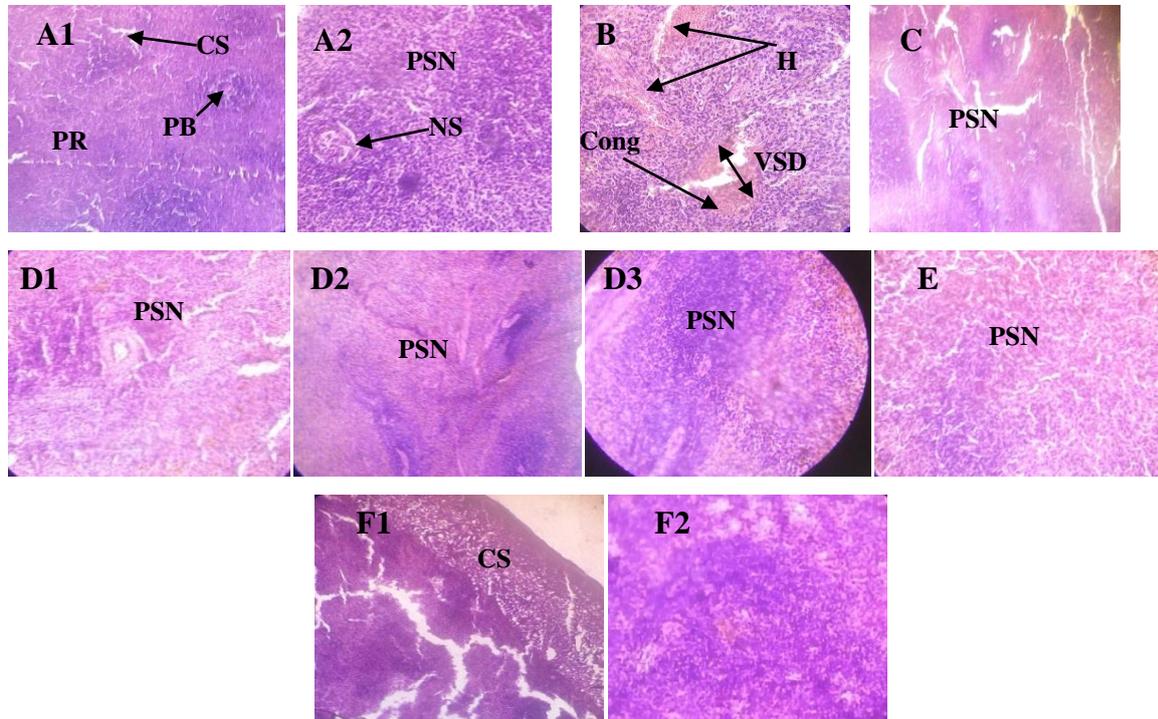
#### **Résultats**

L'observation microscopique des coupes histologiques de la rate a révélé une structure normale chez les témoins (fig. 50 A1-A2).

L'aspect histologique de la rate chez les rats exposés au cuivre montrait des changements histologiques caractérisés par une dilatation de la paroi des artérioles, hémorragie et congestions vasculaires, signes de détériorations cellulaires (fig. 50 B).

Chez le G3 et G5, il a été observé une architecture normale de la rate avec une absence totale de congestion vasculaire ou d'hémorragie (fig. 50 C-E).

Le traitement avec EEP ou HE.P chez les rats du groupe 4 et 6 a empêché toute altération du tissu splénique, de même il a été constaté une architecture similaire à celle observée chez les animaux du groupe témoin (fig. 50 D1-D2-D3-F1-F2).



**Figure 50 :** Coupes histologiques de la rate des rats du groupe : A : Témoin ; B : 2000 ppm de sulfate de cuivre; C: 0.42 ml/kg de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* (HE.P) ; D: une mixture de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et (HE.P) ; E : 2g/Kg d'extrait de persil (EEP) ; F:une mixture de 2000ppm de sulfate de cuivre et 2g/Kg de EEP.  
PSN : parenchyme splénique normale ; PB: pulpe blanche ; PR : pulpe rouge ; CS:Capillaire sinusoidé ;NS : nodule splénique ; H: hémorragie; VSD: vaisseau sanguin dilaté ; Cong:congestion ; CS : capsule splénique .

## Discussion

Les résultats des paramètres hématologiques, et de l'étude phytopathologique indiquaient clairement que le cuivre a modifié la fonction immunitaire de la rate.

D'après les résultats obtenus, les rats exposés au cuivre présentaient un syndrome d'hypersplénisme secondaire aboutissant à une cirrhose qui est caractérisée par une splénomégalie et une nette diminution du nombre de globules rouges, blancs et plaquettes dans le sang.

Il a été montré que le cuivre piégé par les macrophages spléniques par endocytose, formaient des agrégats cytotoxiques. Son accumulation dans les tissus a généré un déséquilibre de

l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (ROS), le foie et la rate étant les principales cibles de ce stress oxydatif accru. Cu s'accumulait dans la rate et provoquait l'apoptose et un dysfonctionnement immunitaire après injection intraveineuse (Sizova et al., 2011).

Une étude très récente a montré que le Cu induisait des dommages évidents à la rate et que la fonction immunitaire a été réprimée par le stress oxydatif et l'inflammation (Zhou et al., 2019).

Par contre, l'administration de HE.P (G4) ou EEP (G6) aux rats exposés au cuivre, a montré un effet protecteur contre la cuprotoxicité de la rate.

*Petroselinum crispum* inhibe la réponse immunitaire cellulaire et humorale en inhibant la prolifération des splénocytes mitogènes. Ainsi, Le persil module les activités des macrophages *in vitro*, par l'inhibition de l'oxide nitrique (NO), confirmant ainsi son potentiel immuno-modulateurs, sans aucun effet cytotoxique. Ses effets biologiques bénéfiques sur le système immunitaire existent en partie grâce aux huiles essentielles. Le persil peut être utile pour la régulation des réponses immunitaires particulièrement pour l'inflammation, et aussi les infections bactériennes qui peuvent déclencher des allergies, des maladies auto-immune et le rejet de greffe (Yousofi et al., 2012).

« Bien que le persil soit utilisé pour traiter les allergies, les maladies auto-immunes et les troubles inflammatoires chroniques, le mécanisme qui sous-tend ses effets bénéfiques dans ces maladies à médiation immunitaire n'a fait l'objet que de rares recherche » (Karimi et al., 2012).

#### **IV.4.2.2.6. Effets du cuivre, l'huile essentielle (HE.P) et l'extrait hydro-éthanolique (EEP) sur les paramètres lipidiques**

Après l'administration de 2000 ppm de Cu aux rats du groupe G2, une augmentation significative de LDL, triglycérides a été remarquée.

Le cuivre entraînait une oxydation des lipides, induisant ainsi des dommages causés par les radicaux libres et une dyslipidémie, ce qui augmente le risque d'athérosclérose et de maladies cardiovasculaires (Joshi et al., 2011).

Chez les rats des groupes 3 et 5, le faible taux de triglycérides qui accompagne généralement les taux élevés de cholestérol HDL pourrait confirmer le mécanisme athéro-protecteur de HE.P et EEP.

Le traitement par HE.P ou EEP diminuait de façon significative les taux sériques de cholestérol total, HDL et LDL comparativement aux rats témoins. Par conséquent, le persil pourrait prévenir l'apparition et le développement de l'athérosclérose.

Hazim et al. (2012) ont rapporté que l'utilisation de régimes alimentaires renfermant différentes teneurs en persil chez des oies locales irakiennes a entraîné une diminution significative des niveaux sériques du cholestérol total, des triglycérides, du C-LDL et du C-VLDL.

L'analyse phyto-chimique du persil a révélé la présence de flavonoïdes (Fejes et al., 2000) qui ont des effets protecteurs contre les maladies cardiaques par leur capacité à prévenir l'oxydation du C-LDL en une forme athérogène, bien qu'une activité d'agrégation antiplaquettaire et des propriétés vasodilatatrices soient également signalées (Duthie et al., 2000).

Le traitement par EEP diminue de façon marquée les teneurs de cholestérol total, LDL, HDL et triglycérides ; de sorte qu'il a une action hypocholestérolémiant et anti-athérogène. En revanche, une augmentation des taux de LDL et triglycérides a été montrée chez les rats de G4 ayant reçu 0.42 ml/Kg de HE.P et 2000 ppm de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O par rapport aux rats exposés au cuivre. Par conséquent, l'extrait hydro-alcoolique (EEP) a un effet hypo-lipédimiant meilleur en comparant avec HE.P. Cela était dû certainement à sa composition riche en flavonoïdes et vitamine C.

L'effet hypolipédimiant de l'extrait de persil sur les taux de cholestérol Total, triglycérides, HDL et de LDL pourrait être attribué à la présence de flavonoïdes, qui jouent un rôle dans la diminution de l'activité des deux enzymes hépatiques 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase et Acyl Coenzyme A Cholestérol O -acyltransférase (ACAT), ou pourrait être due à la présence de certains inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase tels que la vitamine C présente dans le persil (Marzouk et al. 2013 ; Stephens et al., 1996).

Young et ses collaborateurs (2004) ont signalé que l'augmentation du HDL-C favorisait le transport du cholestérol à partir du sérum au foie où il est catabolisé et extrait du corps.

Le persil diminuait le taux de C-LDL en augmentant l'absorption du C-LDL principalement dans le foie (Rudenko et al., 2002).

Plusieurs études confirmaient l'effet hypo-lipédimiant du persil en le comparant avec plusieurs plantes par exemple le caroube et curcuma (El Rabey et al., 2017 ; Elsaid, 2015).

#### **IV.4.2.2.7. Effets de sulfate de cuivre sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotectrice de l'huile essentielle et l'extrait de *Petroselinum crispum***

Dans la présente étude, l'effet protecteur de *Petroselinum crispum* contre l'hépatotoxicité provoquée par le cuivre a été évalué. Une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASATet même le taux de la bilirubine

totale et indirect ont été observées chez les rats du G2.

L'ASAT, L'ALAT sont les principales enzymes utilisées dans le but d'évaluer l'état de la fonction hépatique (Wallace et Meyer, 2010). Ce sont les bio-marqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité (Soudani et *al.*, 2011).

En outre, la présence de bilirubine sérique est généralement due à une destruction fonctionnelle ou mécanique dans l'excrétion biliaire et détectée dans de nombreux cas d'hépatite aiguë et de cholestase (Coppola et *al.*, 2007 ; Xu et *al.*, 2012).

L'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques dans le sang peut être due pratiquement à des lésions tissulaires dans le foie ou en raison de modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire ou également une augmentation de la synthèse ou une diminution du catabolisme des amino-transférases (Frag et *al.*, 2010).

Ainsi, toute nécrose cellulaire, destruction du parenchyme hépatique ou une augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes peut mener à la libération de ces enzymes dans la circulation sanguine et donc à l'augmentation de leurs taux sériques (Adeneye et *al.*, 2006 ; Jodynys-Liebert et *al.*, 2010).

D'après les résultats trouvés, les rats exposés au cuivre présentaient une insuffisance hépatocellulaire (IHC) qui regroupe l'ensemble des manifestations (leucopénie, anémie macrocytaire et thrombopénie) en rapport avec une diminution ou arrêt des fonctions hépatocellulaire ; dont l'aspect clinique est un ictère à bilirubine conjuguée et asthénie ; alors que l'aspect biologique se traduisait par une baisse de cholestérol et l'urée et une augmentation de bilirubine de la forme conjuguée.

L'étude histopathologique confirme nos résultats, dont les rats du groupe G2 exposés au cuivre ont montré une cirrhose hépatique, hémorragie, ballonisation avec infiltrat inflammatoire lymphocytaire et plasmocytaire associée à une congestion et une dilatation des veines Centro-lobulaire. Cela est dû probablement à l'incapacité de tissu hépatique de séquestrer le Cu induisant ainsi une nécrose hépatique.

Ces observations sont en accord avec celles rapportées par Li et *al.* (2008) et Pal et *al.* (2013).

Une étude récente de Samin et *al.* (2016) qui ont montré que l'administration de 1 000 mg/L de Cu par voie intra-péritonéale chez le rat entraînait une augmentation des paramètres de la fonction hépatique et les paramètres du stress oxydatif, notamment TGO, TGP et malondialdéhyde (MDA). L'exposition des rats au cuivre a causé des dommages hépatiques sévères, une dilatation de la veine centrale, un gonflement des hépatocytes et une nécrose.

Par contre le traitement par HE.P ou EEP chez les rats exposés au cuivre pendant huit semaines a réduit significativement l'activité enzymatique des bio-marqueurs hépatiques. L'administration de HE.P ou EEP a pu atténuer les lésions hépatiques induites par le cuivre.

En effet, des tests *in vivo* ont montré que le persil a un effet hépato-protecteur et il est capable de normaliser le taux de glucose dans le sang et diminuer les taux des transaminase hépatiques et la peroxydation lipidique dans foie (Agyare et al ., 2017 ; Bolkent et al ., 2004 ; Ozsoy-Sacan et al ., 2006 ; Khaled et al ., 2019 ; Mahmood et al ., 2014 ).

Le persil agit comme un agent hépato-protecteur. L'huile essentielle de persil très riche en myristicine augmentait le niveau l'activité de l'enzyme détoxifiante glutathion S-transférase (GST) dans le foie tout en arrêtant la peroxydation des lipides (Zheng et al., 1992).

Une autre étude a également montré que l'extrait d'éthanol de persil possédait un potentiel hépato-protecteur significatif chez les rats contre les effets dus au régime alimentaire enrichie au fructose, induisant ainsi la NAFLD (maladie du « foie gras » non-alcoolique). Le potentiel hépato-protecteur du persil peut être attribué à sa teneur en flavonoïdes et en vitamine C, qui éliminent les radicaux libres et à une propriété antioxydante qui aide à atténuer l'inflammation hépatique et la fibrose (Yuneesha et al., 2015).

Par conséquent, le persil augmente l'activité anti-oxydante contre la toxicité induite par le cuivre et agit comme un agent hépato-protecteur.

Plusieurs études suggéraient que le persil a un effet protecteur contre l'hépatotoxicité induite par l'alcool, cisplatine, CDDP, CCL<sub>4</sub> et valproate de sodium (Abou Seif, 2014 ; Jassim, 2013. Abdellatif et al., 2017).

D'après ces résultats, il reste à conclure que l'huile essentielle de persil a assuré un effet hépato-protecteur très intéressant par rapport à l'extrait utilisé contre la toxicité induite par le cuivre.

#### **IV.4.2.2.8. Effet de sulfate de cuivre sur la fonction rénale et l'action néphroprotectrice de l'huile essentielle et l'extrait de *Petroselinum crispum***

L'urémie, avec la créatinémie, constitue un premier indice d'évaluation de la fonction rénale (Chaa, 2019).

L'administration de sulfate de cuivre penta-hydraté a induit une néphrite interstitielle chronique chez les rats du groupe G2, qui se traduisait par une altération importante au niveau des marqueurs de la fonction rénale, une augmentation significative de l'urée et la créatinine, une infiltration lymphocytaire et plasmocytaire ainsi qu'une atrophie tubulaire.

Selon Chalamet, (2015), les dommages néphrotiques induits par le cuivre peuvent être expliqués par l'accumulation d'hémoglobine dans les tubules. Suite à un stress, un relargage d'hémoglobine dans le torrent sanguin provoquait une hémolyse. L'hémoglobinémie résultant est à l'origine d'une néphrose et d'une coloration rénale bleu métal. Induisant ainsi des lésions de nécrose au niveau des tubules rénaux proximaux.

Samin et *al.* (2016) ont montré que l'administration de Cu (1000 mg/L) par voie intrapéritonéale chez le rat a entraîné une augmentation des paramètres de la fonction rénale et des paramètres du stress oxydatif, notamment l'urée, créatinine et mono-aldaldéhyde (MDA).

Le traitement par HE.P ou EEP a montré un effet protecteur contre la toxicité au cuivre tout en préservant la structure rénale et diminuant les paramètres biochimiques rénaux (urée et créatinine).

En outre, le persil exerce son effet néphroprotecteur par l'intermédiaire de son pouvoir antioxydant, anti inflammatoire et diurétique .L'activité anti-oxydante *in vivo* du persil a montré une diminution de ROS, en bloquant les médiateurs nécrotiques, oxydatifs et le stress inflammatoire. Ainsi, réduisant la nécrose et la lésion des cellules rénales, suivies d'une diminution de l'expression de la protéine KIM-1 (Abu-Serie et *al.*, 2019; Darias et *al.*, 2001 ; Kreydiyyeh et Usta , 2002 ).

En effet, le persil est capable d'augmenter la capacité anti-oxydante du tissu rénal tout en réduisant la peroxydation des lipides et l'activation des éléments pro-inflammatoires.

En conséquent, le persil a la capacité d'inhiber l'oxyde nitrite sérique en induisant l'expression de Hémi oxygénase-1 et calmoduline / protéine kinase-4 calcium-dépendante (Jalili et *al.*, 2015). De même, il semble que *P. crispum*, avec son pouvoir anti-oxydant ; il est capable de réduire la MDA et d'augmenter la FRAP dans les groupes de traitement en inhibant la production d'espèces réactives de l'oxygène (Roshankhah et *al.* , 2019) .

Cet effet antioxydant est certainement dû à sa richesse en arsenal d'antioxydants tels que lutéoline, Apigénine, Kaempférol, quercétine, apiin, 6''-Acétylapiin; apiol , myristicine et coumarines. Ce qui le rend pertinent pour le traitement traditionnel des infections urinaires, des néphrites, des cystitis et la prévention de la formation de calculs rénaux. Le persil augmente la diurèse en inhibant le  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pompe d'ATPase dans le rein, ce qui augmente l'excrétion de sodium et l'eau tout en augmentant la réabsorption du potassium (Kreydiyyeh et Usta ,2002 ; Farzaei et *al.*, 2013 ; Peterson et *al.* , 2006) .

Petrolini et *al.* (2013) a montré le potentiel antibactérien de *P. crispum* dans les infections urinaires.

Evidemment, les tests *in vitro* réalisés dans cette étude, confirmaient le pouvoir antibactérien de HE.P et EEP contre les souches *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui pourraient être à l'origine des infections urinaires.

Plusieurs travaux ont confirmé l'effet protecteur de persil contre la néphrotoxicité induite par différents agents tels que streptozotocine , CCL<sub>4</sub> , gentamicine, étoricoxibe et prostadine (Ozsoy- Sacan, 2006 ; Abu-Serie et al ., 2019 ; Mahmoud et al .,2015 ; Shalaby, et Hammoda, 2014 ; Elkhamisy, 2015 ; Al-Ghamdi et AL-Amri , 2016 ) .

Ces résultats confirmaient l'utilisation traditionnelle de persil dans la médecine populaire pour la prévention des maladies rénales.

## Conclusion et perspectives

Actuellement, la phyto-aromathérapie connaît un véritable engouement dans notre pays. Issue de la médecine traditionnelle, la phytothérapie est une tendance qui prend de plus en plus d'ampleur de nos jours. En effet, les recherches scientifiques sont de plus en plus menées dans le domaine de la phyto-aromathérapie et mettent en évidence le rôle important des extraits végétaux et les huiles essentielles en thérapeutique.

Pendant plusieurs millénaires, *Petroselinum crispum* est connue par sa richesse en métabolite secondaire, ses vertus médicinales et ses effets bénéfiques pour la santé. Ainsi, le persil est une solution efficace dans de nombreux troubles et pathologies. Actuellement, ses propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses études scientifiques connues par le monde médical. Le présent travail avait pour but l'étude phyto-chimique, biologique de cette plante et l'évaluation de son pouvoir protecteur contre la toxicité au cuivre ; un oligo-élément essentiel à l'organisme mais à forte concentration peut être mortel pour l'homme.

Le calcul des rendements de l'extrait hydro-éthanolique brut et l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* sont variables selon le mode d'extraction et la partie de la plante utilisée avec des pourcentages respectifs 43.27 et 5.96 %.

Les propriétés physico-chimiques (densité , indice d'acide ,pH, pouvoir rotatoire ..... ) de l'huile essentielle de graines et la partie aérienne de *Petroselinum crispum* sont conformes aux normes de commercialisation des huiles essentielles établies par les différentes pharmacopées. Pour mieux appréhender les vertus thérapeutiques de *Petroselinum crispum* ,il est préalable d'identifier les différents métabolites secondaires présents dans l'extrait hydro-éthanolique et l'huile essentielle de persil qui sont responsables de plusieurs activités pharmacologiques .

Les résultats obtenus de screening phytochimique de la plante *Petroselinum crispum*, ont révélé la richesse de l'extrait brut hydro-éthanolique en métabolites secondaires, où la présence des coumarines, flavonoïdes, stérols et tri-terpène, quinones, saponosides et tanins cathéchiques a été constaté .

Le dosage colorimétrique a mis en évidence l'apport de *Petroselinum crispum* en polyphénols et flavonoïdes. L'extrait alcoolique de cette plante a présenté des taux élevés en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs respectives de (949,60 ± 19.065 µg et 935,56± 21.065 µg EQ\ mg extrait). Alors que le taux le plus faible en polyphénols a été apporté par l'huile

essentielle ( $32,49 \pm 4.16 \mu\text{g EAG/mg}$  d'huile essentielle). Ces dosages ont fait penser à ce qu'il y a toujours une corrélation positive entre les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.

L'identification chimique des huiles essentielles des graines et feuilles de *Petroselinum crispum* par CCM a permis de contrôler la qualité de différentes huiles essentielles, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs des huiles essentielles. Il s'agit essentiellement de monoterpènes, furano-coumarines, allyl-tétraméthoxy-benzène et dillapiol.

L'analyse par GC / SM de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* a permis de confirmer les composés identifiés par CCM. Le profil aromatique de l'huile essentielle de *P. crispum* est très variable ; les monoterpènes sont prépondérants (51.40%) et en plus grande quantité que les phényl-propanoïdes (37.58%) ; avec un pourcentage très faible de sesquiterpènes (1.03%). La séparation et la purification chromatographique des différents phyto-constituants de l'extrait de feuilles de persil par LC /SM a permis d'isoler 17 composés. Trois grandes familles ont été mises en évidence, à savoir ; flavonoïdes, acides phénoliques et un acide gras saturé.

Ces principes actifs majeurs identifiés possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* de l'huile essentielle et l'extrait hydro-alcoolique de *Petroselinum crispum* a été réalisé par deux méthodes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH• et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). Les différents extraits testés présentaient des activités anti-oxydantes intéressantes, dont les valeurs de  $CI_{50}$  étaient classées dans l'ordre du pouvoir antioxydant suivant : l'huile essentielle ( $46,618 \mu\text{g/ml}$ ) > l'extrait hydro-éthanolique ( $2512,7272 \mu\text{g/ml}$ ). Ces résultats étaient confirmés par la méthode de FRAP dont l'huile essentielle détient la capacité anti-oxydante la plus forte comparativement à l'acide ascorbique et l'extrait hydro-éthanolique. Ainsi, la très forte activité anti-oxydante est de l'huile essentielle de *Petroselinum crispum*, pourtant très peu concentré en polyphénols, peut-être cela est attribué à d'autres substances telles que les monoterpènes et phényl-propanoïdes qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

L'huile essentielle et l'extrait hydro-éthanolique de persil ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne *in vitro*, contre huit souches bactériennes pathogènes, en employant la méthode de diffusion sur disques. L'extrait hydro-éthanolique de *Petroselinum crispum* a eu un effet sur les deux bactéries à Gram - : *Salmonella typhimurium*

et *Escherichia coli* et les levures *candidas albicans*. Par contre, les autres souches bactériennes s'étaient révélées résistantes à l'extrait testé. De même, l'huile essentielle de persil présentait une certaine sensibilité contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *candida albicans* avec des diamètres compris entre 8 et 13 mm. Ainsi, l'huile essentielle de *Petroselinum crispum* très riches en mono-terpène présentait des activités anti-bactériennes les plus élevées. En revanche, une plus grande résistance de *citrobacterfrendii*, *enterobactercloacae* et *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'extrait et l'huile testés a été démontrée.

L'administration d'une concentration de 2000 ppm de sulfate de cuivre penta-hydraté par voie orale aux rats a induit une altération des fonctions hépatique, rénale, splénique et cérébrale.

La toxicité du Cu a entraîné une dégénérescence hépatique (cirrhose et stéatose), néphrotique, cérébrale (spongieuse et fibrose), splénique, des congestions capillaires, des infiltrats inflammatoires, des macro-nodules, des plages hémorragiques et carcinome cérébrale.

Cependant le traitement des animaux, exposés préalablement au Cu, avec l'huile essentielle ou l'extrait hydro-alcoolique de *Petroselinum crispum* a permis l'amélioration des niveaux sériques des marqueurs biochimique et hématologique. Cela incitant à affirmer que cette plante est dotée de pouvoir thérapeutique acheminant à une prévention contre les dommages dus à la toxicité du cuivre.

Tous ces résultats ont été confirmés par l'étude histologique des organes (foie, reins, rate et cerveau) qui ont affiché le maintien de leur architecture tissulaire et cellulaire normales chez les animaux traités par les huiles essentielles et extraits du persil.

L'extrait hydro-éthanolique de *Petroselinum crispum* a montré des effets préventifs et anti-toxiques efficaces meilleurs que l'huile essentielle.

Néanmoins, ceci justifie l'utilisation de cette plante en phyto-aromathérapie et confirme la pertinence de ce remède traditionnel dans le traitement de nombreuses pathologies. En terme de perspective, il est envisageable d'entreprendre des recherches cliniques sur les effets de cette plante contre la toxicité au cuivre chez l'Homme visant à confirmer scientifiquement ses effets bénéfiques.

## Références bibliographiques

### (A)

1. Abdel-Halim , A. H., A. A. Fyiad., S. M. Soliman., M. M .Ali., 2015. Amelioration effect of red cabbage extract on copper-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in experimental animals. Int. J. Toxicol. Pharmacol, Res, 7, 185-193.
2. Abdellatif, S. A., Galal, A. A., Farouk, S. M., Abdel-Daim, M. M., 2017. Ameliorative effect of parsley oil on cisplatin-induced hepato-cardiotoxicity : a biochemical, histopathological, and immunohistochemical study. Biomed. Pharmacother, 86, 482–491.
3. Abdel-Tawwab, M ., 2015.The use of American Ginseng (Panax quinquefolium) in practical diets for Nile tilapia (Oreochromis niloticus): resistance to waterborne copper toxicity .Aquaculture Research ,46,1001–1006.
4. Abdullah, A., Jarllah, A., Saleh, A. A., Albaraa, K. A. A., Omar, A. A. A., and Sasikumar, D., 2016. Efficacy of parsley (*Petroselinum crispum*) leaves extract and decoction on status of lipid profile and osmotic fragility in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 8(3), 948-957.
5. Abou El-Leel, O.F., Emam, K.A., Ibrahim, H.M., 2017. Genetic study, chemical composition and volatile oil of two parsley cultivars (*Petroselinum crispum* L.) used in botanical gardens and cultivated under Egyptian conditions. Nature and Science, 15(11) ,83-94 .
6. Abou Seif, H. S., 2014. Effet améliorateur d'huile de persil (*Petroselinum crispum*) contre l'hépatotoxicité induite par l'alcool et le stress oxydatif. Medical Journal Research, Volume 13, Numéro 2 - p 100-107.
7. Aboushouk, S .S.O . , Asmaa , A ., Samar ,S.E., 2018. The Potential Ameliorative Effect of Nano-Zinc and Zinc Against Copper Hepatorenal Toxicosis in Rats. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, 57 (1) ,148-160.
8. Abu-Serie, M.M., Habashy, N. H., Maher, A.A., 2019. In vitro anti-nephrotoxic potential of Ammi visnaga, Petroselinum crispum, Hordeum vulgare, and Cymbopogon schoenanthus seed or leaf extracts by suppressing the necrotic mediators, oxidative stress and inflammation .BMC Complementary and Alternative Medicine, 19, 149.
9. Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I., Bello, S.O., 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of Musanga cecropioides in rats. Journal of Ethnopharmacology, 105, 374-379.
10. AFEDI., 2018. Aromathérapie scientifique : préconisations pour la pratique clinique, l'enseignement et la recherche, consensus d'experts. Consulté le 06/10/2019. <https://afedi.com/Documentation/Article/108>
11. AFNOR NF T 75-006., 2000. Association Française de Normalisation, Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles", AFNOR, Paris.
12. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)., 2019. Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement. Pharmacopée.
13. Agra, D.R., Evangelista, A., Marcucci, M.C., 2006. Physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the extracts propolis of the Paraiba, Brazil. Cienc Rural, 36(6),1842-1848.
14. Agyare, C., Appiah , T. , Boakye, Y. D., Apenteng, J., 2017. *Petroselinum crispum*: A Review. In: Kuete V, editor. Medicinal Spices and Vegetables from Africa, Elsevier, chapter 25 , 527-547.
15. Alam, M. N., Bristi , N. J. ,Rafiquzzaman ,M.d .,2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21,143– 152.
16. Al-Daraji , H.J., Al-Hassani, A.S., Al-Mashadani, H.A., Al-Hayani ,W.K., Mirza ,H.A., 2012. The Influence of Parsley (*Petroselinum crispum*) as Feed Additive on Hematological Traits of Local Iraqi Geese .Advances in Nutrition Research, 1(1), 1-5.
17. Al-Ghamdi , F.A.M., AL-Amri ,A.S.M., 2016. The protective role of parsley oil on kidney of the albino rat offsprings against toxicity of Etoricoxib drug (Arcoxia). Life Science Journal , 13 (9).
18. Al-Haadi ,M.H., Al Rahbi ,S.S., Akhtar, M.S., Said, S., Weli ,A., Al Riyami, Q., 2013. Phytochemical screening, antibacterial and cytotoxic activities of *Petroselinum crispum* leaves grown in Oman. Iran J Pharm Sci , 9, 61–65.
19. Al-Hadi , A.H., Al Rahbi ,S.S., Akhtar ,M.S., Said, S., Weli , A., Al-Riyami, Q., 2013.

- Phytochemical screening, antibacterial and cytotoxic activities of *Petroselinum crispum* leaves grown in Oman. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 9(1) ,61-65.
20. Al-Howiriny, T., Al-Sohaibani, M., El-Tahir, K., et al. , 2003.Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. Am JChin Med, 31(5), 699-711.
  21. Alghobashy, A.A., Alkholy, U.M., Talat, M.A., Abdalmonem, N., Zaki, A., Ahmed , I.A., Mohamed , R .H. ,2018.Trace elements and oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. Diab Metab Syndr Obesity Targets Ther ,11 , 85–92.
  22. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., 2015.Essential oils used in aromatherapy : A systemic review. Asian Pac J Trop Biomed, 5(8) ,11–601 .
  23. Aljanaby, A.A.J.J., 2013. Antibacterial activity of an aqueous extract of *Petroselinum crispum* leaves against pathogenic bacteria isolated from patients with burns infections in Al-najaf Governorate, Iraq. Res Chem Intermed, 39 (8), 3709-3714.
  24. Al-khazraj , S. M. , 2015.Studying the Analgesic, Anti-inflammatory and Antipyretic Properties of The Aqueous Extract of *Petroselinum crispum* in Experimental Animal Models. IOSR Journal Of Pharmacy, Vol 5, Issue 9, PP. 17-23.
  25. Allam, A. A., Maodaa, S. N., Abo-eleneen, R ., Ajarem, J., 2016. Protective Effect of Parsley Juice (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) against Cadmium Deleterious Changes in the Developed Albino Mice Newborns (*Mus musculus*) Brain. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 2646840.
  26. Al-Naimi, R.A ., Al-Tayar ,N.H., Alsoufi ,L.A .M ., Al-Taae ,E.H.Y.,2013.Hematological and biochemical evaluation after different orally doses of copper sulfate in rats. Iraqi J Vet Med, 38(1) ,83–91.
  27. Amr, F., Hatem, A., Abdel Rahman , A., et al., 2018. Aroma volatile compounds of parsley cultivated in the Kingdom of Saudi Arabia and Egypt extracted by hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction. International Journal of Food Properties, Vol.20, No.sup3, p.S2868.
  28. Anses ., 2017. Table de composition nutritionnelle des aliments, CIQUAL. [www.anses.fr](http://www.anses.fr). Consulté le : 05/10/2019.
  29. Aref, M., Heded, M., 2015. Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale Cleome arabica L (Région d'Oued Souf). Diplôme de Master Académique en Sciences Biologiques .Université d'EL-Oued (Algérie).
  30. Arnal, N., Morel, G.R., de Alaniz, M.J.T., Castillo, O., Marra, C.A. ,2013.Role of copper and cholesterol association in the neurodegenerative process. Int J Alzheimer's Dis, 10,1–15.
  31. Arous , S., 2012. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de *Fredolia aretioides*. Thèse de Master, Biologie . Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen (Algérie).
  32. Atari-Hajipirloo, S., Valizadeh , N., Khadem-Ansari ,M.H , Rasmi., Y., and Kheradmand , F., ,2016. Altered Concentrations of Copper, Zinc, and Iron are Associated With Increased Levels of Glycated Hemoglobin in Patients With Type 2 Diabetes. Int J Endocrinol Metab, 14(2), e33273.
  33. Attou, A., 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent.Thèse de Magister en Biologie. Université de Tlemcen (Algérie).
  34. Atwood, C.S., Scarpa, S.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones , W.D., Fairlie ,D.P., Tanzi ,R.E., Bush ,A.I. , 2000.Characterization of copper interaction with Alzheimer amyloid b peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid b1-42. J Neurochem, 75,1219–1233.
  35. Avinash , P. Ingle ., Priti , P., Sudhir ,S., Indarchand ,G., Jayanta ,K. B., Luiza ,H. d. M. and Mahendra ,Rai., 2018.Copper in Medicine: Perspectives and Toxicity .In : Applications of Metals in Medicine. Mahendra Rai et al ., pp 95-112.
  36. Ayaz, M., A, Sadiq., M, Junaid., F, Ullah. , M, Ovais., I, Ullah. , M, Shahid., 2018. Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic propensity in aging associated neurological disorders. Front. Aging Neurosci. (In Press).

(B)

37. Babaei, H., Kheirandish , R.,Ebrahimi,L.,2012. The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine , 2(3) , S1615-S1619.
38. Babar, A.M., Hahn , E.J., Paek, K.Y., 2007 . Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative

- Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molécules*, 12, 607-621.
39. Badiaga, M., 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat, université de Bamako. 10 p.
  40. Bahare, S., Alessandro, V., Mehdi, S., Dorota, K., Javad, S., Alessandra, D., Massimo, L., Antonello, S., Eliana, S., Ettore, N., Hubert, A., Elena, A., William, S., Natália, M., 2019. "The Therapeutic Potential of Apigenin". *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, no. 6, pp. 1305.
  41. Bahnas, M.S., M.S. Ragab., NEA, A. and R.M.S. Eman., 2009. Effect of using parsley or its by-product with or without enzyme supplementation on performance of growing Japanese quail. *Egypt Poultry Sci*, 29 (1), 241-262.
  42. Bandmann, O., Weiss, K.H., Kaler, S.G., 2015. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*, 14, 103-113.
  43. Barnham KJ, Bush AI. 2014. Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem Soc Rev*, 43, 6727-6749.
  44. Beddou, F., 2015. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex veicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie. Université de Tlemcen (Algérie).
  45. Beernesh, B. R., Tacquet, A., 1996. Manuel de techniques bactériologiques. 2<sup>ème</sup> Ed. Paris, 572.
  46. Békro, Yves-Alain., Békro, J. A. M., Boua, B. B., TRA, B. F. H., Éhilé, E. E., 2007. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences & Nature*, Vol. 4 N<sup>o</sup>2, 217 - 225.
  47. Belmekki, N., Bendimerad, N., Bekhechi, C., Fernandez, X., 2013. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14), 897-902.
  48. Bertini, I., Cavallaro, G., McGreevy, K.S., 2010. Cellular copper management-a draft user's guide. *Coord Chem Rev*, 254, 506-524.
  49. Bhattacharjee, A., Chakraborty, K., Shukla, A., 2017. Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics*, 9, 1376-1388.
  50. Bisceglie, F., Baldini, M., Belicchi-Ferrari, M., Buluggiu, E., Careri, M., Pelosi, G., Pinelli, S., Tarasconi, P., 2007. Metal complexes of retinoid derivatives with antiproliferative activity: synthesis, characterization and DNA interaction studies. *Eur J Med Chem*, 42, 627-634.
  51. Blockhuys, S., Wittung-Stafshede, P., 2017. Roles of copper-binding proteins in breast cancer. *Int J Mol Sci*, 18, E871.
  52. Bolkent, S., Yanardag, R., Ozsoy-Sacan, O., et al., 2004. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on the liver of diabetic rats: a morphological and biochemical study. *PhytotherRes*, 18(12), 996-999.
  53. Bouchekrit, M., 2018. Etude de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles de deux apiaceae *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. et *Margotia gummifera* (Desf.) Lange. Mémoire de docteur, Biologie végétale. Université Ferhat Abbas Sétif (Algérie).
  54. Boufadi, Y.M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., Boudjeltia, K.Z., Van Antwerpen, P., 2014. Characterization and Antioxidant Properties of Six Algerian Propolis Extracts: Ethyl Acetate Extracts Inhibit Myeloperoxidase Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 2327-2345.
  55. Bougandoura, N., 2011. Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calaminthasspnepta* (nabta) et *Ajugaiwa* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Thèse de magister, Biologie. Université Abou Bakr Belkaid (Tlemcen -Algérie).
  56. Bounihi, A., 2016. Criblage phytochimique, étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de doctorat, Sciences du Médicament. Université Mohamed V, Rabat (Maroc).
  57. Brewer, G.J., 2014. The promise of copper lowering therapy with tetrathiomolybdate in the cure of cancer and in the treatment of inflammatory disease. *J Trace Elements Med Biol*, 28, 372-378.
  58. Brewer, G.J., 2003a. Copper in medicine. *Curr Opin Chem Biol*, 7, 207-212.
  59. Brewer, G.J., 2003b. Copper-lowering therapy with tetrathiomolybdate for cancer and diseases of fibrosis and inflammation. *J Trace Elem Exp Med*, 16, 191-199.
  60. Brewer, G.J., Johnson, V.D., Dick, R.D., Fink, K.J., Kluin, K.J., Hedera, P., 2000. Treatment of Wilson's disease with zinc XVII: Treatment during pregnancy. *Hepatology*, 31(2), 364-370.
  61. Brooks, J. L., Jefferson, K. K., 2014. Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 10, e1004292.
  62. Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> ed. Paris, Tec & Doc Lavoisier.

63. Butler ,P., McIntyre ,N., Mistry, P.K. , 2001.Molecular diagnosis of Wilson disease. Mol Genet Metab ,72,223–230.
64. Butnariu , M., Butu, A., 2015. Handbook of Food Chemistry, P.C.K. Cheung, B.M. Mehta (editors). Springer-Verlag Berlin Heidelberg , 627.

(C)

65. Caesar , L.N., 2007. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle gabonaise : Terminalia catappa Linn. (Combretaceae) et Kalanchoe crenata (Andr.) Haw. (Crassulaceae). Thèse de Doctorat Université de Bamako Mali, p 142.
66. Calvo, J., Jung , H., Meloni, G., 2017. Copper metallothioneins. IUBMB Life , 69, 236–245.
67. Caratini , R., 1983 . “La vie des plantes ”. Bordas Encyclopédie, 589.
68. CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie., 2019. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed , p.20 .
69. Cerone ,S.,I, Sansinanea, A.S., Streitenberger, S.A., Garcia , M.C. , Auza, N.J . ,2000.Cytochrome c oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. Biol Trace Elem Res, 73, 269–278.
70. Cerpa , W., Varela-Nallar ,L., Reyes, A.E., Minniti ,A.N., Inestrosa ,N.C ., 2005.Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? Mol Aspects Med, 26 ,405–420.
71. Chaa, S ., 2019. Effet protecteur de la propolis de Tizirt sur l'hépatotoxicité, la cardiotoxicité et la néphrotoxicité induites par l'épirubicine .Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Mostaganem (Algérie).
72. Chalamet, J., 2015.Toxiques rénaux et biomarqueurs : essai de cartographie des différents modes d'action des substances néphrotoxiques en médecine vétérinaire. Thèse de doctorat .Université de médecine, Créteil.
73. Chandler , A.M . , 2008. Treatment for asthma, arthritis, and other inflammatory diseases . US Patent App, 11 ,569 -212 .
74. Chandra ,S. , Dwivedi, P., Arti ,K. M. , Shinde, L. P. ,2016. An Industrial Cultivation of Tulsi (*Ocimum sanctum*) for Medicinal Use and Rural Empowerment .Journal of Medicinal Plants Studies ,4(6), 213- 218.
75. Chauhan , E. S ., Aishwarya, J ., 2018. Nutraceuticals Potential of *Petroselinum Crispum*: A Review. J Complement Med Alt Healthcare, J 7(2), 555707.
76. Chaves ,D.S.A., Frattani , F.S., Assafim , M., de Almeidac, A.P ., Zingali , R.B ., Costa, S.S. , 2011.phenolic chemical composition of *Petroselinum crispum* extract and its effect on Haemostasis.In: Natural Product Communications, 6(7), 961-964 .
77. Chellan , P., Sadler, P.J., 2015.The elements of life and medicines. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 373, 20140182. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0182> .
78. Cheurfa, M., Allem, R., Zabel, K. et al. ,2017 . Phytothérapie. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1116-1>.
79. Cholewińska , E., Ognik , K., Fotschki ,B., Zduńczyk ,Z., Juśkiewicz, J., 2018.Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. PLoS ONE, 13, e0197083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197083>
80. Christian , A. , Theresa, A ., Yaw, D. B., John ,A. A., 2017 .*Petroselinum crispum*. In : Medicinal Spices and Vegetables from Africa.Victor Kuete, pp.527-547 .
81. Christophe, B ., 2019. Persil (*Petroselinum crispum*) - nutritif, dépuratif, diurétique. <https://www.altheaprovence.com/blog/persil-petroselinum-crispum-nutritif-depuratif-diuretique/>. Consulté le : 04/10/2019.
82. Cooper ,G.J., Chan ,Y.K., Dissanayake ,A.M., Leahy ,F.E., Keogh ,G.F., Frampton, C.M., Gamble, G.D., Brunton ,D.H., Baker ,J.R., Poppitt ,S.D., 2005.Demonstration of a hyperglycemia-driven pathogenic abnormality of copper homeostasis in diabetes and its reversibility by selective chelation: Quantitative comparisons between the biology of copper and eight other nutritionally essential elements in normal and diabetic individuals. Diabetes, 54,1468–1476.
83. Concilli , M., Iacobacci , S., Chesi ,G., Carissimo, A., Polishchuk ,R., 2016.A systems biology approach reveals new endoplasmic reticulum-associated targets for the correction of the ATP7B mutant causing

- Wilson disease. *Metallomics*, 8, 920.
84. Coppola, N., Genovese, D., Pisaturo, M., Taffon, S., Argentini, C., Pasquale, G., 2007. Acute hepatitis with severe cholestasis and prolonged clinical course due to hepatitis A virus Ia and Ib coinfection. *Clin Infect Dis*, 44(9), e73–7.
  85. Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, P.B., Coelho, N., Anabela, R., 2012. Thymus lotocephalus wild plants and in vitro culture produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1253-1260.
  86. Cousin, R.J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.*, 65, 238–309.
  87. Craft, D. J., Setzer, N. W., 2017. The volatile components of parsley, *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5(1), 27–33.
  88. Cypryk, W., Lorey, M., Puustinen, A., Tuula, A., Nyman, T.A., Matikainen, S., 2017. Proteomic and bioinformatic characterization of extracellular vesicles released from human macrophages upon influenza A virus infection. *J Proteome Res*, 16, 217–227.

(D)

89. Daira, N.H., Maazi, M.C., Chefrou, A., 2016. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. de l'Est Algérien, *Bull. Soc. r. sci. Liège*, 85, 276 – 290.
90. Damabi, N.M., Moazedi, A.A., Seyyednejad, S.M., 2010. The role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in the spasmolytic effects on rat ileum of *Petroselinum crispum Latifolium* (parsley). *Asian Pac Jof Tro Medicine*, 866–70.
91. Daniel, K. G., Chen, D., Orlu, S., Cui, Q.C., Miller, F.R., Dou, Q.P., 2005. Cloquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 7, R897–R908.
92. Darias, V., Martin-Herrera, D., Abdala, S., and Fuente, D., 2001. "Plants used in urinary pathologies in the Canary islands". *Pharm Biol*, 39, 170-180.
93. Da Silva, S.L., Vellas, B., Elemans, S., Luchsinger, J., Kamphuis, P., Yaffe, K., Sijben, J., Groenendijk, M., Stijnen, T., 2013. Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Dement*, 10, 1–18.
94. Date and time info., 2019. <http://dateandtime.info/fr/citycoordinates.php?id=2482572>. Consulté le: 16/10/2019.
95. Davies, K.M., Mercer, J.F.B., Chen, J.N., Double, K.L., 2016. Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics. *Clin Sci*, 130, 565–574.
96. De Feo, C.J., Aller, S.G., Unger, V.M., 2007. *Biometals*, 20, 705.
97. De Romana, L., Olivares, M., Uauy, R., Araya, M., 2011. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J Trace Elem Med Biol*, 25, 3–13.
98. Deyson, G., 1954. *Éléments d'anatomie des plantes vasculaires* Ed. SEDES. Pp, 5-13.
99. Didier, D., 2000. "Huiles essentielles", Monographie relative aux huiles essentielles (A à G). 6<sup>ème</sup> ED, AFNOR, Tome 2, Vol, 1, 180 -219.
100. Djelti, A., Belkhedim, Z., 2016. Contribution à l'étude des activités biologiques des huiles essentielles du *Myrtus nivellei*. Thèse de Master en Biotechnologie Végétale. Saida (Algérie).
101. Dobričević, N., Šic, Ž. J., Voća, S., Plietić, S., Galić, A., Delić, A., Fabek, U. S., 2019. Bioactive compounds content and nutritional potential of different parsley parts (*Petroselinum crispum* Mill.). *Journal of Central European Agriculture*, 20(3), 900-910.
102. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* vol 88, pp308-316.
103. Du, Y., Lou, H., 2008. Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol*, 591, 96–101.
104. Duke, J. A., M.J.B. G., and A.R. Ottesen., 2009. *Medicinal Plants of Latin America*. Taylor & Francis Group, LLC.
105. Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 13, 79-106.

(E)

106. Easmon, J. 2002., Copper and iron complexes with antitumor activity. *Expert Opin Ther Pat* ,12,789–818.
107. Edrees, M.G., El-Gayar, A.H., El Habibi, M.E., Salem, T.E., 2015. Protective effect of *Petroselinum crispum* or eruca sativa extracts on testes against dioxin intoxication in rats. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. Vol: 2 Issue, 7, 57-66.
108. El-Barbary, M.I., Mehrim, A.I., 2009. Protective effect of antioxidant medicinal herbs, rosemary and parsley, on subacute a flat osteosis in *Oreochromh nilolкус*. *J Fish Aquat Sci*, 4,178-90.
109. Elkhamisy, A.E., 2015. Protective Effect of Parsley Leaves and Turmeric Roots Extracts against Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Male Rats. *World Journal of Dairy & Food Sciences* ,10 , 1-8.
110. El Rabey, H.E., Al-Seeni, M.N., and Al-Ghamdi, H.B., 2017. Comparison between the Hypolipidemic Activity of Parsley and Carob in Hypercholesterolemic Male Rats. *Biomed Res Int*, 3098745.
111. Elsaid, F.G., 2015. Role of curcuma longa and petroselinum crispum against the molecular and physiological changes associated with hypercholesterolemia induced in male rats. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary*, 2(3), 205-223.
112. Eskici, G., Axelsen, P.H., 2012. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* , 51, 6289–6331.

(F)

113. Faa, G., Lisci, M., Caria, M.P., Ambu, R., Sciote, R., Nurchi, V.M., Silvagni, R., Diaz, A., Crisponi, G., 2001. Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol* ,15, 155–160.
114. Falleh, H., Ksoury, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331, 372-379.
115. Fan, C.D., Su, H., Zhao, J., Zhao, B.X., Zhang, S.L., Miao, J.Y., 2010. A novel copper complex of salicylaldehyde pyrazole hydrazone induces apoptosis through up-regulating integrin  $\beta 4$  in H322 lung carcinoma cells. *Eur J Med Chem*, 45, 1438–1446.
116. Farag, A.T., Amany, H., Radwan, F., Sorour, Ahmed, E., El-Sayed, E., Abd El-Khaliek, E., 2010. Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 29 , 80-85.
117. Farshori, N.N., Al-Sheddi, E.S., Al-Oqail, M.M., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A.A., Siddiqui, M.A., 2014. Cytotoxicity assessments of *Portulaca oleracea* and *Petroselinum sativum* seed extracts on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). *Asian Pac J Cancer Prev* , 15(16), 6633–8.
118. Farzaei, M.H., Abbasabadi, Z., Reza, M., Ardekani, S., Rahimi, R., 2013. Review Parsley : a review of ethnopharmacology , phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(6), 815–826.
119. Fejes, S., Blazovics, A., Lemberkovics, E., Petri, G., Szoke, E., Kery, A., 2000. Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracted fractions of parsley. *Acta Alimentaria* ,29 , 81-87.
120. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine., 2006. In: *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*, Copper. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD, editors. National Academy Press; Washington, pp. 304–311.
121. Fraga CS., 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*, 26,235–244.
122. Friedman, M., Henika, P.R., Mendrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65 (10) ,1545- 1560.

(G)

123. Gadi, D., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A., Legran, C., Laveve, F.F., Mekhfi, H., 2009. Parsley extract inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 170-174.
124. Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189,147–163.
125. Galib, B.M., Mashru, M., Jagtap, C., Patgiri, B.J., Prajapati, P.K., 2011. Therapeutic potentials of metals in ancient India: a review through Charaka Samhita. *J Ayurveda Integr Med* ,2, 55–63.

126. García-Carrasco , B., Fernandez-Dacosta ,R., Dávalos , A., Ordovás ,J.M., Rodriguez-Casado ,A., 2015 . Med. Sci., 3, 38.
127. Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6, 391-415.
128. Giachin , G., Mai ,P.T., Tran ,T.H, Salzano , G., Benetti ,F., Migliorati, V., Arcovito ,A., Della Longa, S., Mancini ,G., D'Angelo ,P., Legname ,G., 2015.The non-octarepeat copper binding site of the prion protein is a key regulator of prion conversion. *Sci Rep*, 5, 15253.
129. Gill , A .O ., Holley ,R. A., 2004. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytigenes* and of Eugenol against *L. monocytigenes* and *Lactobacillus Sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (10) , 5750.
130. Gilles, G., 2014. Le persil en phyto-aromathérapie . Books of donte 40. Gille gras, editor. <https://booksofdante.wordpress.com/2014/07/25/le-persil/>.
131. Google Maps/Google Earth Additional Terms of Service, 2019. [https://www.google.com/help/terms\\_maps/](https://www.google.com/help/terms_maps/). Consulté le: 16/10/2019.
132. Gomez –Caravaca , A.M., Gomez-Romero , M., Arraez- Roman , D., Segura-Carretero , A., Fernandez-Gutierrez , A., 2006 . Advances in the analysis of phenolic compounds in Products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234.
133. Gonzalez-Dominguez , R., Gracia-Barrera, T., Gomez-Ariza, J.L., 2014.Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics*, 6,292–300 .
134. Govahi , A., Moazedi, A .A., Seyyednejad ,S. M., Poormehdi-Broojeni ,M., 2015.The role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the antispasmodic effect of flavonoid from *Petroselinum crispum* (parsley) leaf on adult male rat ileum. *Feyz* , 18 (6) ,546-552 .
135. Grassmann, J., 2005. Terpenoids as plant antioxidants. *J. Vitam. Horm.* 72: 505-535.
136. Grieve , M., 2014. <https://www.botanical.com/botanical/mgmh/p/parsle09.html>. Consulté le: 02/10/2019.
137. Guerrero ,J.A., Navarro-Nunez, L., Lozano ,M.L., Martinez, C., Vicente ,V., Gibbins ,J.M., Rivera, J. ,2007 .Flavonoids inhibit the platelet TxA2 signaling pathway and antagonize TxA2 receptors (PT) in platelets and smooth muscle cells. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64 , 133-144.
138. Gun-Ae ,Y., Sunmin ,P. , 2014 . Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. *Nutrition Research and Practice* , 8(6), 618–624.
139. Gupta ,A ., Lutsenko, S., 2009.Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Futur Med Chem*, 1(6), 1125–1142.
140. Gupte , A. , Mumper ,R. J., 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 35, 32–46.
141. Gupte , A., Mumper RJ.,2007.Copper chelation by D-penicillamine generates reactive oxygen species that are cytotoxic to human leukemia and breast cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 43, 1271–1278.

#### (H)

142. Haddouchi , F., Chaouche ,T.M ., Halla, N .,2016. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie .*Phytothérapie* .DOI 10.1007/s10298-016-1086-8 .
143. Hadjadj, S., 2017. Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien. Thèse de doctorat, Biologie .Université Kasdi Merbah (Ouargla).
144. Hajji ,T., Mansouri ,S., Vecino-Bello ,X., Cruz-Freire , J.M., Rezugui, S., Ferchichi , A. ,2018. Identification and characterization of phenolic compounds extracted from Barley husks by LC-MS and antioxidant activity in vitro. *Journal of Cereal Science*,81 ,83-90 .
145. Harris , E.D.,1991.Copper transport: An overview. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 196, 130–140.
146. Harris ,E.D., Qian ,Y., Tiffany-Castiglioni ,E., Lacy, A.R., Reddy ,M.C.,1998.Functional analysis of copper homeostasis in cell culture models: a new perspective on internal copper transport. *Am J Clin Nutr*, 67(5 Suppl),988S–995S.
147. Hassan, I.I., Askar, A.A, and El-Shourbagy ,G .A. , 2004. Influence of some medicinal plants on performance; physiological and meat quality traits of broiler chicks. *Egypt Poul SCI*, 24, 247-266.
148. Hazim ,J., Al-Daraji ,H.A., Al-Mashadani, H.A., Mirza ,A..S, Al-Hassani WK, Al-Hayani. ,2012. The

- effect of utilization of parsley (*Petroselinum crispum*) in local Iraqi geese diets on blood biochemistry. J Am Sci , 8 , 427- 432.
149. Heidari ,T., Moazedi ,A.A., Seyyednejad ,S.M., Borojeni ,M.P., 2018. The role of histaminergic H2 receptors on spasmolytic activity of hydroalcoholic extract of parsley (*Petroselinum crispum*) seeds in isolated rat's ileum. J Nat Rem ,17, 114-24.
150. Hellal , Z., 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister. Université de Tizi-Ouzou, 120p.
151. Holst, P. B., and K ,C . Engvild., 2000. Natural chlorinated compounds. 17th Danish plant Protection Conference Overview / environment / weeds. DJF – Rapport, Markbrng. No, 23 , 87-95.
152. Hordyjewska , A., Popiołek ,L., Kocot, J., 2014. The many faces of copper in medicine and treatment. Biometals, 27(4), 611–621.
153. Horvath, I., Wittung-Stafshede , P., 2016. Cross-talk between amyloidogenic proteins in type-2 diabetes and Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 113, 12473–12477.
154. Hozayen ,W. G., El-Desouky ,M .A., Soliman ,H. A., Ahmed ,R.R ., Khaliefa ,A. K ., 2016. Antiosteoporotic effect of *Petroselinum crispum*, *Ocimum basilicum* and *Cichorium intybus L.* in glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. BMC Complement. Altern. Med., Vol. 16. 10, 1186/s12906-016-1140-y.

(I)

155. Inesi , G., Pilankatta, R., Tadini-Buoninsegni ,F., 2014. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. Biochem J, 463, 167–176.
156. INSA ., 2015. Mise au point d'une technique de séparation et de quantification des composés présents dans une huile essentielle. Consulté le 06/10/2019. <file:///C:/Users/asus/Downloads/Rapport%20PE%20huiles%20essentielles%202015.pdf>
157. Irene ,M ., Estrella ,S., Manuel ,V., Casilda, N., Esther ,S., 2016, Foods – Article . Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain, 5, 18.
158. Ito , S., Fujita ,H., Narita, T., Yaginuma ,T., Kawarada ,Y., Kawagoe, M., Sugiyama ,T., 2001. Urinary copper excretion in type 2 diabetic patients with nephropathy. Nephron , 88, 307–312.

(J)

159. Jack, H., Kaplan, J.H., Maryon ,E.B., 2016. How mammalian cells acquire copper: An essential but potentially toxic metal. Biophys J, 110, 7–13.
160. Jalili , C., Salahshoor ,M.R., Naderi, T. , 2015 .The effect of hydroalcoholic extract of *P. crispum* on sperm parameters, testis tissue and serum nitric oxide levels in mice. Adv Biomed Res , 4, 40.
161. Jassim, A.M., 2013. Protective Effect of *Petroselinum crispum* (parsley) extract on histopathological changes in liver, kidney and pancreas induced by sodium valproate-in male rats. Kufa J Vet Med Sci, 4(1), 20–7.
162. Jesus ,C ., 2017. Persil. <https://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/persil.htm#description-botanique-du-persil>. Consulté le 02/10/2019.
163. Jodynis-Liebert, J., Nowicki, M., Murias, M., Adamska, T., Ewertowska, M., Kujawska, M., Piotrowska, H., Konwerska, A., Ostalska-Nowicka, D., Pernak, J., 2010. Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyl dimethyl ammonium saccharinate, in rats. Regul Toxicol. Pharmacol, 57, 266-273.
164. Jorgenson, T.C., Zhong ,W., Oberley ,T.D., 2013. Redox imbalance and biochemical changes in cancer. Cancer Res, 73, 6118–6123.
165. Joshi , V.R., Mallick, A.K., Goud ,M., Maradi ,R., Reddy ,M.G., Tey ,R., Shorey ,G. , 2012 .Effect of serum copper concentration and ceruloplasmin on lipid parameters leading to increased propensity to cardiovascular risk. RJPBCS , (2), 558-563 .

(K)

166. Kaler, S.G., 2013. Inborn errors of copper metabolism. *Handb Clin Neurol*, 113, 1745–1754.
167. Kaler, S.G., 2011. ATP7A-related copper transport diseases - emerging concepts and future trends. *Nat Rev Neurol*, 7, 15–29.
168. Karimi, M.H., Ebadi, P., Amirghofran, Z., 2012. Parsley and immunomodulation. *Expert Rev Clin Immunol*, 8(4), 295-297.
169. Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogunbuaja, V.O., 2004. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *Medical Science*, 4, 179-182.
170. Katerji, M., Barada, K., Jomaa, M., Kobeissy, F., Makkawi, A-K., Abou-Kheir, W., Usta, J., 2017. Chemosensitivity of U251 cells to the co-treatment of D-penicillamine and copper: possible implications on Wilson disease patients. *Front Mol Neurosci*, 10, 10.
171. Kaur, C., and Kapoor, H.C., 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. of Food Sc. and Tech*, 37, 153-161.
172. Kery, A., Blazovics, A., Fejes, S., Nagy, E., Lugasi, A., Kursinszki, L., Czinner, E., Kristo, T. S. A., Balazs, A., and Szoke, E., 2001. Antioxidant activity of medicinal plants used in phototherapy. *Intern J Hort Sci*, 7, 28-35.
173. Khaled, B., Alfi, K., Fairuz, M. C. Q., Che, A. C. M., Wan, M. A. W. S., Ridhwan, A. W., Qamar, U. A., Majid, A. G., Mohd, Z. S., Mohamed, F. A., Hesham, E., 2019. Optimization of hyperglycemic induction in zebrafish and evaluation of its blood glucose level and metabolite fingerprint treated with *Psychotria malayana* Jack leaf extract. *Molecules*, 24, 1506 (ISI-Indexed).
174. Khalil, N., Ashour, M., Fikry, S., Naser, S.A., Salama, O., 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected apiaceous fruits. *Future J. Pharm, Sci* 4(1), 88–92.
175. Khoshdel, Z., Naghibalhossaini, F., Abdollahi, K., Shojaei, S., Moradi, M., Malekzadeh, M., 2016. Serum copper and zinc levels among Iranian colorectal cancer patients. *Biol Trace Elem Res*, 170(2), 294–299.
176. Khoudali, S., Benmessaoud, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., 2014. Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *J. Mater. Environ, Sci*, 5(3), 887-898.
177. Kim, B.E., Nevitt, T., Thiele, D.J., 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol*, 4(3), 176–185.
178. Kim, J., Kim, J., Bae, J-S., 2016. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Exp Mol Med*, 48, e269.
179. Kirshner, J.R., He, S., Balasubramanyam, V., Kepros, J., Yang, C-Y., Zhang, M., Du, Z., Barsoum, J., Bertin, J. 2008., Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol Cancer Ther*, 7, 2319–2327.
180. Kolarovic, J., Popovic, M., Zlinska, J., Trivic, S., Vojnovic, M., 2007. Antioxidant activities of celery and parsley juices in rats treated with doxorubicin. *Molecules*, 15, 6193–6204.
181. Kosseva, M.R., 2013. Chapter 6. Functional Food and Nutraceuticals Derived from Food Industry Wastes. 1st Ed. London, Singapore.
182. Kreydiyyeh, S. I., Usta, J., and Kaouk, I., 2001. "The mechanism underlying the laxative properties of parsley extract". *J. of Phytomed*, 8(5), 382-388.
183. Kuan-Hsun, W., Wen-Jui, L., Tzu-Chun, C., Hui-Wen, C., Li-Ching, C., Chia-Chang, C., Hsiu-Man, L., Teng-Nan, L., Yuan-Soon, H., 2019. "Study of the antitumor mechanisms of apiole derivatives (AP-02) from *Petroselinum crispum* through induction of G0/G1 phase cell cycle arrest in human COLO 205 cancer cells," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 19, no. 1.
184. Küffer, A., Lakkaraju, A.K., Mogha, A., Petersen, S.C., Airich, K., Doucerain, C., Mrpakwar, R., Bakirci, P., Senatore, A., Monnard, A., Schiavi, C., Nuvolone, M., Grosshans, B., Hornemann, S., Bassilana, F., Monk, K.R., Aguzzi, A., 2016. The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adrg6. *Nature*, 536, 464–468.
185. Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, M., Górecki, J., Stojko, M., Sosada, and G, Świerczek-Zięba., 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecule*.

(L)

186. Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P., 1993. Étude des arlypropènes extraits de l'huile essentielle des fruits de persil [*Petroselinum Crispum* (MILL.) A. W. HILL] Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 132, 90-98.
187. Langley, A., Dameron, C.T., 2013. Copper and anesthesia: clinical relevance and management of copper related disorders. *Anesthesiol Res Pract*, art, 750901.
188. Lautrette, S., 2004. Utilisation des fibres de carbone activé comme catalyseurs de O-et Nglycosylation: Application à la synthèse d'analogues de saponines et de nucléosides. Thèse de doctorat, Limoges, Université de Limoges.
189. Lazouni, H. A., Benmansour, A., Taleb-Bendiab, S.A., Chabane Sari, D., 2007. *Sciences & Technologie*. C-N° 25, 7-12.
190. Lee, I.C., Ko, J.W., Park, S.H., Lim, J.O., Shin, I.S., Moon, C., Kim, S.H., Heo, J.D., Kim, J.C., 2016. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats. *Int. J. Nanomed*, 11, 2883–2900.
191. Lee, J., Petris, M., Thiele, D. J., 2002. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctrl high affinity transporter. Identification of a Ctrl-independent copper transport system. *J Biol Chem*, 277, 4380–4387.
192. Lee, S., Han, S., Kim, H. M., Lee, J. M., Mok, S. Y., Lee, S., J, K.S., 2011. *Appl. Biol. Chem*, 54(1), 73.
193. Li, Y.W., Wang, X.H., Nin, Q., Luo, X.P., 2008. Excessive copper induces hepatocyte apoptosis and affects Bax and Bcl-2 expression in rat liver. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 101, 42–46.
194. Lian, W.J., Wang, X.T., Xie, C.Z., Tian, H., Song, X.Q., Pan, H.T., Qiao, X., Xu, J.Y., 2016. Mixed-ligand copper(II) Schiff base complexes: the role of the co-ligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity. *Dalton Trans*, 45, 9073–9087.
195. Liddell, J.R., White, A.R., 2017. Nexus between mitochondrial function, iron, copper and glutathione in Parkinson's disease. *Neurochem Int*. pii, S0197–0186(17)30250–4.
196. Linde, G.A., Gazim, Z.C., Cardoso, B.K., Jorge, L.F., Tešević, V., Glamočlija, J., Soković, M., Colauto, N.B., 2016. Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil. *Genet Mol Res*, 15(3).
197. Liu, L., Geng, X., McDermott, J., Shen, J., Corbin, C., Xuan, S., Kim, J., Zuo, L., Liu, Z., 2016. Copper deficiency in the lungs of TNF- $\alpha$  transgenic mice. *Front Physiol*, 7, 234.
198. Lorincz, M.T., 2010. Neurologic Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1184, 173–187.
199. Loziene, K., Venskutonis, P.R., 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem Syst Ecol*, 33, 517–525.
200. Lutsenko, S., 2010. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 211–217.

(M)

201. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International Editions.
202. Mahmood, S., Hussain, S., Malik, F., 2014. Critique of medicinal conspicuousness of Parsley (*Petroselinum crispum*): a culinary herb of Mediterranean region. *Pak J Pharm Sci*, 27(1), 193-202.
203. Mairif, S., 2015. Contribution à l'étude de l'effet toxique des pesticides à usage domestique utilisé en Algérie. thèse de doctorat, Biologie. Université 8 Mai 1945- Guelma (Algérie).
204. Majjob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H.R., 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of pharmaceutical Research*, 77-82.
205. Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M.J., Barel, A.O., 1998. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, vol 84, 368- 376.
206. Marín, I., Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Navarro, C., Sendra, E., 2016. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain. *Foods*, 5(18), 1–10.
207. Martin, G. R., Alvarez, A.L., Bashashati, M., Keenan, C.M., Jirik, F.R., Sharkey, K.A., 2012. Endogenous cellular prion protein regulates contractility of the mouse ileum. *Neurogastroenterol*

- Motil,24,e412–e424.
208. Marwa , M. A., Noha, H. H., Adham, M. M., 2019. In vitro anti-nephrotoxic potential of Ammi visnaga, *Petroselinum crispum*, *Hordeum vulgare*, and *Cymbopogon schoenanthus* seed or leaf extracts by suppressing the necrotic mediators, oxidative stress and inflammation. BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 19, no. 1.
209. Maryon, E.B., Molloy, S.A., Zimmnicka ,A.M., Kaplan, J.H ., 2007. Copper entry into human cells: progress and unanswered questions. Biometals 20(3–4), 355–364.
210. Marzouk, M., Soliman, A.M. , and Omar, T.Y., 2013. Hypoglycemic and antioxidative effects of fenugreek and termis seeds powder in streptozotocind diabetic rats. European Review\ for Medical and Pharmacological Sciences, 17,559-565.
211. Materia, S., Michael, A., Cater, M.A., Klomp ,L.W..J, Mercer ,J. F.B. , La Fontaine ,S., 2011. Clusterin (Apolipoprotein J), a molecular chaperone that facilitates degradation of the copper-ATPases ATP7A and ATP7B. J Biol Chem, 286,10073–10083.
212. McMillan ,K.J., Korswagen, H.C., Cullen ,P.J., 2017. The emerging role of retromer in neuroprotection. Curr Opin Cell Biol, 47,72–82.
213. Mendel ,M., Chłopecka ,M., Dziekan ,N., 2007. Haemolytic crisis in sheep as a result of chronic exposure to copper. Pol. J. Vet. Sci, 10 (1), 51-56.
214. Mert , A., Timur , M., 2017. Essential oil and fatty acid composition and antioxidant capacity and total phenolic content of parsley seeds (*Petroselinum crispum*) grown in Hatay region. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51(3),437-440.
215. Messaoudene, H.,Sbargoud ,Y., 2015. Contribution à l'étude, phytochimique, pharmacologique et rhéologique de *Pulicaria odora*. Thèse de Master, Biologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (Algérie).
216. Mischley, L.K., Conley, K.E., Shankland ,E.G., Kavanagh, T.J., Rosenfeld, M.E., Duda ,J.E., White, C.C., Wilbur ,T.K., De La Torre ,P.U., Padowski, J.M., 2016. Central nervous system uptake of intranasal glutathione in Parkinson's disease. NPJ Parkinson's Dis,2, 16002.
217. Mital, M., Wezynfeld ,N.E., Frączyk, T., Wiloch, M.Z., Wawrzyniak, U.E., Bonna ,A., Tumpach, C., Barnham ,K.J., Haigh ,C.L., Bal ,W., Drew ,S.C.,2015. A functional role for Aβ in metal homeostasis? N-truncation and high-affinity copper binding. Angew Chem Int Ed, 254,10460–10464.
218. Moon, J. K., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57,1655–1666.
219. Mohammed ,S.A., Bakery, H.H., Abou Salem ,M.E., Nabila ,A.M., Elham ,A.E., 2014. Hepatotoxic effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives in albino rats. Benha.Vet.Med.J, 27(1), 146-156.
220. Morrell , S., Tallino ,L., Lei ,Y., Burkhead, J.L.,2017. The role of insufficient copper in lipid synthesis and fatty-liver disease. IUBMB Life, 69,263–270.
221. Moulay, K ., Harig ,M ., 2016. contribution à l'inventaire des plantes médicinales utilisées dans la région de Saida .Thèse de Master en biotechnologie végétale. Saida (Algérie).
222. Mpondo , E., Yinyang , J ., Dibong , S. D., 2015. Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun), p 7804– 7823.
223. Mpondo , M. E., Dibong ,S.D., Ladoh ,Y.C.F., Priso ,R.J., Ngoye ,A., 2012. Les plantes à phénols utilisées par les populations de la ville de Douala. Journal of Animal & Plant Sciences, 15, 2083-2098.

(N)

224. Nasulewicz ,A., Mazur ,A., Opolski, A.,2004. Role of copper in tumour angiogenesis clinical implications. J Trace Elem Med Biol , 18,1–8.
225. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS document M100- S11. USA: Villanova, vol. 21, n° 1.
226. Nedović, V., Raspor, P., Lević, J., Tumbas Šaponjac, V., Barbosa-Cánovas, G.V. (Eds.) ., 2016 .Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food . 1ST Ed .Serbia . Number of Pages 478.
227. Neumann ,W., Gulati ,A. , Nolan, E.M., 2017. Metal homeostasis in infectious disease: recent advances in bacterial metallophores and the human metal-withholding response. Curr Op Chem Biol, 37,10–18.
228. N'Guessan , K., Soro, D., Amon ,A. ,2011. Plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies cardiovasculaires, en pays Abbeï et Krobou dans le sud de la Côte d'Ivoire.

- Phytothérapie, 9, 199-208.
229. Nichols ,T.A., Spraker, T.R., Gidlewski, T., Cummings, B., Hill ,D., Kong, Q., Balachandran, A., VerCauteren ,K.C., Zabel ,M.D.,2016.Dietary magnesium and copper affect survival time and neuroinflammation in chronic wasting disease. *Prion*,10, 228–250.
230. Nielsen ,S.E. , Young ,J.F., Daneshvar ,B., Lauridsen, S.T., Knuthsen ,P., Sandstrom, B., 1999. Effect of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British J. Nutrition*, 81, 447-455.
231. Nirumand ,M.C., Hajialyani, M., Rahimi, R., Farzaei, M.H., Zingue ,S., Nabavi ,S.M., Bishayee, A., et al., 2018.Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones: Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci* ,19,765.
232. Noda ,Y., Asada ,M., Kubota ,M., Maesako, M., Watanabe, K., Uemura, M., Kihara ,T., Shimohama, S., Takahashi, R., Kinoshita, A., Uemura, K ., 2013. Copper enhances APP dimerization and promotes Ab production. *Neurosci Lett* ,547,10–15.
233. Noipa , T., Supalax ,S., Thawatchai ,T., Wittaya ,N., 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food search International*, 44 , 798-806.

(O)

234. Ojala ,T., Remes, S., Haansuu ,P., et al., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol* , 73(1), 299-305.
235. Okita, Y., Rcom-H'cheo-Gauthier, A.N., Goulding, M., Chung, R.S., Faller, P., Pountney, D.L., 2017. Metallothionein, copper and alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *Front Neurosci*,11,114.
236. Oloyede ,O.I., 2005. Chemical Profile of Unripe Pulp of carica papaya. *Pakistan Journal of nutrition*, 4 , 379-381.
237. Orch , H., Douira, A., & Zidane, L., 2015. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète, et des maladies cardiaques dans la région d'Izarène (Nord du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 86 , 7940-7956.
238. Osman, M ., K ,H. Amber ., and M ,A .,Mahmoud., 2004. Response of broiler chick's performance to partial dietary inclusion of raddish, rocket and parsley cakes. *Egypt Poult Sci* , 24, 429-446.
239. Osredkar, J., Sustar ,N., 2011.Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol* , S 3,001. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>.
240. Ouis, N., 2015. Chemical and Biological Study of Essential Oils of Coriander, Fennel and Parsley. Doctoral Thesis in Organic Chemistry. Algeria: University of Oran 1.
241. Ozsoy-Sacan, O., Yanardag, R., Orak, H., et al., 2006. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornurideon the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Eth-nopharmacol* ,104(1-2), 175-181.

(P)

242. Pal, A., Badyal ,R.K., Vasishta, R.K., Attri, S.V., Thapa ,B.R., Prasad ,R .,2013. Biochemical, histological, and memory impairment effects of chronic copper toxicity: A model for non-Wilsonian brain copper toxicosis in Wistar rat. *Biol Trace Elem Res* ,153 (1-3), 257-268.
243. Pape, V.F.S., Türk, D., Szabó, P., Wiese, M., Enyedy , E.A., Szakács, G.,2015. Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives. *J Inorg Biochem*, 144, 18–30.
244. Papuc, C., Predescu ,C., Nicorescu, V., Stefan ,G., Nicorescu, I., 2016. Antioxidant Properties of a Parsley (*Petroselinum crispum*) Juice Rich in Polyphenols and Nitrites. *Curr Res Nutr Food Sci*, 4.
245. Pavlova, N.N., Thompson, C.B., 2016. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*, 23 (1), 27–47.
246. Perrone , L., Grant, W.B., 2015.Observational and ecological studies of dietary advanced glycation end products in national diets and Alzheimer's disease incidence and prevalence. *J Alzheimer's Dis*, 45,965–979.
247. Perry , J.J., Staley , J.T., Lory , S., 2004.Microbiologie. Cours et questions de révision. Ed. Dunod.
248. Peterson, S., Lampe, J.W., Bammler, T.K., Gross-Steinmeyer, K. and Eaton, D.L. , 2006 .Apiaceous Vegetable Constituents Inhibit Human Cytochrome P-450 1A2 (hCYP1A2) Activity and hCYP1A2-Mediated Mutagenicity of Aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*,44 , 1474-1484.
249. Petko, I. P., 2010. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de

- plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse.
250. Petrolini, F.V., Lucarini, R., de Souza, M.G., Pires, R.H., Cunha, W.R., Martins, C.H., 2013. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Braz J Microbiol*, 44(3), 829-834.
251. Pineda, R., Vizcaíno, S., García, M.C., Gil, H.J., Durango, D., 2018. Antifungal activity of extracts, essential oil and constituents from *Petroselinum crispum* against *Colletotrichum acutatum*. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 71(3), 8563-8572.
252. Podsedek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*, 40, 1-11.
253. Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C., et Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684p.
254. Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie industriel*, 4, 25-39.
255. Puqazhenthil, S., Qin, L., Reddy, P.H., 2017. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica*, 1863(5), 1037-1045.
256. Puig, S., Thiele, D., 2002. Molecular mechanism of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, 6, 171-180.

(R)

257. Ragab, M.S., Magda, R.A., Farhat, G.S., 2010. Effect of molukhyia or parsley feeding on carcass characteristic, glutathione peroxidase enzyme activity and meat quality of two broiler strains. *Egypt Poultr Sci*, 30 (1), 353-389.
258. Ramos, D., Mar, D., Ishida, M., Vargas, R., Gaite, M., Montgomery, A., Linder, M.C., 2016. Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PLoS ONE*, 11, e0149516.
259. Ramzani, G.A., Ezzati, G.F., 2018. Effect of purslane on kidney failure following copper toxicity in a rat model. *Iranian Journal of Health Sciences*, 6(1), 25-32.
260. Rashwan, N.M., 2012. Biological Study on the Effect of Arginine Parsley and on Renal Toxicity in Rats". *World Journal of Medical Sciences*, 7 (4), 264-269.
261. Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3-12.
262. Rayment, W.J., 2016. <http://www.indepthinfo.com/parsley/history.shtml>. Consulté le : 02/10/2019.
263. Remmal, A., 2017. Lauréat du Prix de l'inventeur européen dans la catégorie Prix du public – Document 'Office européen des brevets'. [https://www.epo.org/learning-events/european-inventor/finalists/2017/remmal\\_fr.html](https://www.epo.org/learning-events/european-inventor/finalists/2017/remmal_fr.html). Consulté le : 20/12/2019.
264. Reyhaneh, S., 2012. Antioxidant activity exhibited by medicinal plants, vegetables and fruits from North of Iran. *Research Signpost Trivandrum*, 205-236.
265. Rezazad, M., Farokhi, F., 2014. " Protective effect of *Petroselinum crispum* extract in abortion using prostadin-induced renal dysfunction in female rats". *Avicenna J Phytomed*, 4(5), 312-319.
266. Roshankhah, S., Jalili, C., Salahshoor, M.R., 2019. Protective effects of *Petroselinum crispum* on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Physiology and Pharmacology Physiol Pharmacol*, 23, 129-139.
267. Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Deisenhofer, J., 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*, 298, 2353-2361.

(S)

268. Sabry, R.M., Kandil, M.A.M., Ahmed, S.S., 2013. Comparative study of some Parsley cultivars grown in Egypt for some potent compounds. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(10), 6419-6424.
269. Samin, B., Fachrial, E., Refilda, Zulkarnain, C., and Almahdy., 2016. Protective Effect of Aqueous Extract of *Annona muricata* Leaves Against Copper Induced Hepatotoxicity in Experimental Rats.

- RJPBCS 7(6) Page No. 880 .
- 270.Santini, C., Pellei, M., Gandin ,V., Porchia ,M., Tisato ,F., Marzano ,C.,2014. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*,114,815–862.
- 271.Sarvu ,K., Jose, J., Bhat ,M .N., Jimmy, B., Shastry, B.A., 2007. Acute ingestion of copper sulphate : A review on its clinical manifestations and management. *Ind. J. Crit. Care. Med*, 11, 74-80.
- 272.Sbai , H., Saad , I., Ghezal , N., Greca , M.D., Haouala ,R.,2016. Bioactive compounds isolated from *Petroselinum crispum* L. leaves using bio-guided fractionation. *Industrial Crops and Products*,89,207-214.
- 273.Scheiber, I.V., Bruha , R., Dusek, P., 2017. Pathogenesis of Wilson disease. In: Członkowska A, Schilsky ML, editors. *Handbook of clinical neurology*, Vol. 142, Chapter 5: Elsevier .
- 274.Semeniuc, C.A., Pop, C.R., Rotar, A.M. , 2017.Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Food Drug Anal* , 25,403–408.
- 275.Semeniuc, C.A., Socaciu, M.I., Socaci, S.A., Mureşan , V., Fogarasi, M., Rotar, A.M.,2018. Chemometric Comparison and Classification of Some Essential Oils Extracted from Plants Belonging to Apiaceae and Lamiaceae Families Based on Their Chemical Composition and Biological Activities. *Molecules*, 23(9), 2261.
- 276.Shalaby, M.A., and Hammada, A.A. ,2014 .Evaluation of Nephroprotective and Diuretic Effects of Parsley and Turmeric Herbs on Gentamicin Nephrotoxic Rats. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* , 3 , 1729-1744.
- 277.Sharif, R., Thomas, P., Zalewski ,P. , Fenech, M .,2012.The role of zinc in genomic stability. *Mutat Res*, 733,111–121.
- 278.Sharma, M.C., Joshi ,C., Pathak ,N.N., Kaur, H., 2005.Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Res Vet Sci*, 79,113–12. <https://www.organicfacts.net>. Consulté le : 07 Septembre 2019.
- 279.Shim , H., Harris, Z.L., 2003.Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr*, 133,1527S–1531S.
- 280.Shimberg ,G.D., Ok ,K., Neu ,H.M., Splan ,K.E., Michel, S.L.J., 2017.Cu(I) disrupts the structure and function of the nonclassical zinc finger protein tristetruprolin (TTP) *Inorg Chem*,56, 6838–6848.
- 281.Si ,L., Chen ,Y., Han, X., Zhan ,Z., Tian ,S., Cui ,Q., Wang ,Y. , 2012 .Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. *Molecules*, 17,7057–7066.
- 282.Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152–178.
- 283.Sinopoli ,A., Magri ,A., Milardi, D., Pappalardo ,M., Pucci, P., Flagiello, A., Titman, J.J., Nicoletti ,V.G., Caruso ,G., Pappalardo, G., Grasso, G. , 2014.The role of copper(II) in the aggregation of human amylin. *Metallomics* ,6, 1841.
- 284.Sizova ,E., Glushchenko ,N., Miroshnikov ,S., Skalny ,A., 2011. Influence of Cu10x copper nanoparticles intramuscular injection on mineral composition of rat spleen. *J. Trace Elem. Med. Biol*, 25, S84–S89.
- 285.Small ,S.A., Petsko, G.A.,2015. Retromer in Alzh eimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*, 16,126–132.
- 286.Soon ,C.P.W., Donnelly, P.S., Turner ,B.J., Hung, L.W., Crouch ,P.J., Sherratt, N.A., Tan ,J.L., Lim ,N.K.H., Lam, L., Bica ,L., Lim ,S., Hickey, J.L., Morizzi ,J., Powell ,A., Finkelstein, D.I., Culvenor, J.G., Masters, C.L., Duce, J., White, A.R., Barnham ,K.J., Li, Q.X.,2011. Diacetyl bis (N(4) methylthiosemi-carbazonato) copper(II) (CuII(atms)) protects against peroxynitrite-induced nitrosative damage and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Biol Chem*, 286, 44035–44044.
- 287.Soliman ,H.A., Eltablawy, N.A., Hamed , M.S. ,2015.The ameliorative effect of *Petroselinum crispum* (parsley) on some diabetes complications. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3(4),92-100.
- 288.Soudani, N., Benamara, I., Sefi, M., Boudawara, T., Zeghal, Na., 2011. Effects of selenium on chromium (VI)- induced hepatotoxicity in adult rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63 ,541-548.
- 289.Stan, M., Soran, M.L., Varodi, C.,and Lung, I.,2012. Extraction and identification of flavonoids from Parsley extracts by HPLC analysis. *AIP Conf. Proc*, 1425, 50-52.Vol.4 (3) , pp .179-182. Nigeria.
- 290.Stanyon ,H.F., Patel ,K., Begum ,N., Viles, J.H., 2014. Copper(II) sequentially loads onto the N-terminal amino group of the cellular prion protein before the individual octarepeats. *Biochemistry*,53,3934–3939.
- 291.Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas ,E.C., Bell ,A.J., Heesom ,K.J., Tavare, J.M., Cullen, P.J.,2013. A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat Cell Biol*,15,461–471.

292. Stephens, N.G., Parsons, A., Schofield, P.M., Kelly, F., Cheeseman, K., and Mitchinson, M.J., 1996. Randomized control trial of vitamin E in patients with coronary disease. Cambridge heart antioxidant study. *Lancet*, 347(9004), 781-786.
293. Stern, B.R., 2010. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: Overview, update and regulatory considerations. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 73, 114-127.
294. Stern, B.R., Solioz, M., Krewski, D., Aggett, P., Aw, T.C., Baker, S., Crump, K., Dourson, M., Haber, L., Hertzberg, R., Keen, C., Meek, B., Rudenko, L., Schoeny, R., Slob, W., Starr, T., 2007. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modelling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, 10, 157-222.
295. Squitti, R., Mendez, A.J., Simonelli, I., Ricordi, R., 2017. Diabetes and Alzheimer's disease: can elevated free copper predict the risk of the disease? *J. Alzheimer's Dis*, 56(3), 1055-1064.

(T)

296. Tadros, L.K., El-Rafey, H.H., Elfadaly, H. A., Taher, M.A., Elhafny, M.A., 2017. Phenolic Profile, Essential oil Composition, Purification of Kaempferol 3- arabinofuranoside and Antimicrobial Activity of Parsley Cultivated in Dakhalia Governorate. *J. Agric. Chem. and Biotechnol.*, Mansoura Univ, 8 (7), 183 – 189.
297. Taleb –Toudert, K., 2015. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *callosobruchus maculatus* (Coleoptera :Bruchidae). Université de Tizi -Ouzou (Algérie).
298. Tang, E.L., Rajarajeswaran, F.S.Y., Kanthimathi, M.S., 2015. *Petroselinum crispum* has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2763-2771.
299. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 57, 386-398.
300. Takahashi, Y., Miyajima, H., Shirabe, S., Nagataki, S., Suenaga, A., Gitlin, J.D., 1996. Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet*, 5, 81-84.
301. Tekwu, E. M., Pieme, A. C., Beng, V. P., 2012. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 142, n° 1, pp. 265-273.
302. Telianidis, J., Hung, Y.H., Materia, S., LaFontaine, S., 2013. Role of the P-type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front Aging Neurosci*, 5, 44.
303. The Telegraph., 2012. The kiss of copper. Published on May 7, 2012. Consulté le : 07/09/2019. Available at: [https://www.telegraphindia.com/1120507/jsp/knowhow/story\\_15458385.jsp](https://www.telegraphindia.com/1120507/jsp/knowhow/story_15458385.jsp).
304. Toni, M., Massimino, M.L., DeMario, A., Angiulli, E., Spisni, E., 2017. Metal dyshomeostasis and their pathological role in prion and prion-like diseases: the basis for a nutritional approach. *Front Neurosci*, 11, 3.
305. Trifunski, Svetlana., Ardelean, Dorina., 2012. Quantification of phenolics and flavonoids from *Petroselinum crispum* extracts. *Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal)* Vol. XV, issue 1-4, pp. 83-86.
306. Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc*, 101, 294-301.
307. Tucker, A. O., DeBaggio, O., 2009. Encyclopedia of herbs. Timber Press. Portland: Oregon, Pp 393-394.
308. Tuli, H.S., Tuorkey, M.J., Thakral, F., Sak, K., Kumar, M., Sharma, A.K., Sharma, U., Jain, A., Aggarwal, V., and Bishayee, A., 2019. Molecular Mechanisms of Action of Genistein in Cancer: Recent Advances. *Front. Pharmacol*, 10, 1336.
309. Turnlund, J., Scott, K., Peiffer, G., Jang, A., Keyes, W., Keen, C., Sakanashi, T., 1997. Copper status of young men consuming a low-copper diet. *Am. J. Clin. Nutr*, 65, 72-78.
310. Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., Scott, K.C., 1998. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope <sup>65</sup>Cu. *Am. J. Clin. Nutr*, 67, 1219-1225.

(U)

311. United States Environmental Protection Agency Basic Information about Copper in Drinking Water., 2013. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/copper.cfm>. Updated December 19, 2013.
312. Yousofi, A., Daneshmandi ,S., Soleimani ,N., Bagheri, K., Karimi, M.H .,2012. Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: Mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages .*Immunopharmacology and Immunotoxicology* ,34 (2), 303-308.
313. Uriu-Adams ,J.Y., Keen ,C.L.,2005.Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* ,26,268–298.
314. Usta, J.,2002. Diuretic Effect and Mechanism of Action of Parsley. *Journal of Ethnopharmacology* , 79 , 353-359.

(V)

315. Vardar-Ünlü ,G., F. Candan., A. Sökmen., D. Daferera., M. Polissiou., M. Sökmen, E. Dönmez ., B. Tepe., 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. & Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agr. Food Chem*, 51, 63-67.
316. Viles ,J.H. ,2012. Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord Chem Rev*,256, 2271–2284.
317. Vincent, D.T., Ibrahim, Y.F., Espey, M.G., Suzuki, Y.J., 2013. The role of antioxidants in the era of cardio- oncology. *Cancer. Chemother. Pharmacol*, 72, 1157–1168.
318. Viuda-Martos, M., El Gendy, A.E.N.G., Sendra, E., Fernandez-Lopez, J., Abd El Razik, K., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., 2010. Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some egyptian plants. *J. Agric. Food Chem*, 58 , 9063–9070 .

(W)

319. Wallace, A.D., Meyer, S.A., 2010. Hepatotoxicity. In: Smart RC, Hodgson E (eds) *Molecular and biochemical toxicology*. 4th edn. Wiley, Hoboken, 671-692.
320. Wang ,F., Jiao ,P., Qi ,M., Frezza ,M., Dou ,Q.P., Yan, B.,2010. Turning tumor-promoting copper into an anti-cancer weapon via high-throughput chemistry. *Curr Med Chem*, 17,2685–2698.
321. Ward ,E.M., Keen ,C.L. and McArdle ,H.J., 2003. The impact of copper on human health. International Copper Association Ltd., New York. Available at: [www.copperinfo.com](http://www.copperinfo.com).
322. Watson J.D.,2014. Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet*.383:841–843. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62365-X. [Wazir SM, Ghobrial I.2017.Copper deficiency, a new triad: anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *J Comm Hosp. Intern Med. Perspect*, 7(4),265–268
323. Wezynfeld, N.E., Stefaniak, E., Stachucy, K., Drozd ,A., Płonka, D., Drew, S.C., Krężel, A., Bal ,W.,2016. Resistance of  $\text{Cu}(\text{A}\beta 4-16)$  to copper capture by metallothionein-3 supports a function for the  $\text{A}\beta 4-42$  peptide as a synaptic  $\text{Cu}(\text{II})$  scavenger. *Angew Chem Int Ed*,55,8235–8238.
324. Wiemann ,P., Perevitsky, A., Lim, F.Y., Shadkchan, Y., Knox, B.P., Landero, F. J.A., Choera ,T., Niu ,M., Steinberger ,A.J., Wüthrich, M., Idol ,R.A., Klein, B.S., Dinauer, M.C., Huttenlocher, A., Oshero, N., Keller, N.P., 2017. *Aspergillus fumigatus* copper export machinery and reactive oxygen intermediate defense counter host copper-mediated oxidative antimicrobial offense. *Cell Rep*,19,1008–1021.
325. Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res*, 37, 99–105.
326. Wojtunik, K.A., Ciesla ,L.M., Waksmundzka-Hajnos ,M.,2014. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *J Agric Food Chem* , 62(37) ,9088-94.
327. Wu ,X., Leegwater, P.A.J., Fieten, H .,2016. Canine models for copper homeostasis disorders. *Int J Mol Sci*, 17(2),196. <https://doi.org/10.3390/ijms17020196>.
328. Wulf, M.A., Senatore ,A., Aguzzi ,A., 2017. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol*, 15:34.

(X)

329. Xu ,B., Yu, H.B., Hui ,W., He, J.L., Wei, L.L., Wang, Z., et al .,2012 .Clinical features and risk factors of acute hepatitis E with severe jaundice. World J Gastroenterol,18 (48) ,7279–84.
330. Xu ,J., Church ,S.J., Patassini, S., Begley, P., Waldvogel, H.J., Curtis, M.A., Faull ,R.L.M., Unwin ,R.D., Cooper, G.J.S .,2017.Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia.
331. Xuerong ,Z., Ling, Z., Jie, L., Huaqiao, T., Min, X., Yanyan, W., Xiaoyu, Y., Helin, C., Yinglun ,L., Gang ,Y., Fei, S., Cheng, L., and Bo, J .,2019. The Toxic Effects and Mechanisms of Nano-Cu on the Spleen of Rats. International Journal of Molecular Sciences, vol. 20, no. 6, pp. 1469

(Y)

332. Yagmurca, M., Erdogan, H., Iraz, M., Songur, A., Ucar, M., and Fadillioglu, E., 2004. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats,” Clinica Chimica Acta, vol. 348, no. 1(2), 27–34.
333. Yahata ,S., Yung ,S., Mandai ,M., Nagahara, T., Kuzume ,D., Sakaeda ,H., Wakusawa ,S., Kato ,A., Tatsumi ,Y., Kato, K., Hayashi, H., Isaji ,R., Sasaki ,Y., Yano, M., Hayashi, K., Ishigami ,M., Goto, H.,2017. Phenotypes and chronic organ damage may be different among siblings with Wilson's disease. J Clin Transl Hepatol, 28,27–30.
334. Yanardag, R., Bolkent , S., Tabakoglu-Oguz, A., Ozsoy-Sacan ,O., 2003. Effects of etroselinum crispum extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26(8) ,1206-1210.
335. Yassine ,M., Arlette ,L., Jean-Claude, D., Hervé, p., Jean-Dominique, p ., 2013. Thérapeutique. Avancées majeures dans le domaine du médicament vétérinaire au cours des 40 dernières années. Le Point vétérinaire (Éd. Expert canin), ISSN 2110-5146, Vol. 44, N°. 340, (Ejemplar dedicado a: Dossier. De 1973 à 2013: 40 ans de formation au service des praticiens), págs. 24-29
336. Yen ,C.F., Harischandra, D.S., Kanthasamy, A., Sivasankar ,S.,2016.Copper-induced structural conversion templates prion protein oligomerization and neurotoxicity.Sci Adv,2, e1600014.
337. Yousofi ,A., Daneshmandi, S., Soleimani ,N., Bagheri ,K., Karimi ,M.H . , 2012.Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: Mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages .Immunopharmacology and Immunotoxicology ,34 (2), 303-308.
338. Yuneesha, N., Balakrishanan ,N. , Victor, A . S., 2015. Experimental study Petroselinum crispum extract attenuates hepatic steatosis in rats fed with fructose enriched diet . Bratisl Med J , 116 (9) ,547 – 553.

(Z)

339. Zaitsev ,V.N., Zaitseva, I., Papiz ,M., Lindley ,P.F.,1999. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. J. Biol. Inorg. Chem, 4,579–587.
340. Zhang , H., Chen, F., Wang, X., Yao, H.Y. ,2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. Food Res Int, 39 , 833–839.
341. Zheng ,G.Q., Kenney ,P.M., Zhang ,J., Lam, L.K., 1992. Inhibition of benzo [a] pyrene – induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. Carcinogenesis, 13 (10), 1921-1923.
342. Zhou ,X. ,Zhao ,L., Luo, J., Tang ,H.,Xu ,M., Wang, Y.,Yang ,X., Chen ,H., Li, Y., Ye, G.,Shi, F., Lv, C., and Jing ,B., 2019 . The Toxic Effects and Mechanisms of Nano-Cu on the Spleen of Rats. International Journal of Molecular Sciences ,20(6), 1469.
343. Ziai, S.A., Muradganj, A., 2017.Effects of aqueous extract of parsley on prevention of nerve cells peroxidation in an experimental model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxy dopamine in male rat. The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Research in Medicine. Vol.41, No.4, 17-23.
344. Zitouni ,A.,2017. Profil polyphénolique et activité antioxydante de deux plantes médicinales Pistacia lentiscus. L et Gymnocarpus decander. forsk .Thèse de Doctorat en Biologie .Université de Tlemcen (Algérie).
345. Zovko, C. M., Kremer, D., Karlović, K., Kosalec , I., 2010. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of Berberis vulgaris L. and Berberis croatica Horvat. Food Chem Toxico, 48 , 2176 – 2180.

## **Annexes**

### **1. Montage de dispositif d'hydro distillation**

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

### **2. Technique de la double coloration**

La structure anatomique des feuilles et tiges de *Petroselinum crispum* a été observée en effectuant des coupes minces parfaitement orientées qui seront soumises à une double coloration au rouge –Congo –vert de méthyl. Cette technique consiste à mettre un fragment de végétal entre 2 morceaux de moelle de sureau et d'effectuer des coupes à main levée avec une lame de rasoir, le mouvement doit être perpendiculaire au grand axe de l'organe pour les sections transversales. Les coupes sont récupérées dans des verres de montre contenant de l'hypochlorite de sodium pendant 5 à 20 mn. Les coupes sont rincées abondamment pendant 5 mn. Elles sont ensuite soumises à l'action d'un bain d'acide acétique (1%) pendant 1 mn pour neutraliser l'action de l'hypochlorite de sodium et faciliter la fixation des colorants sur les parois cellulaires.

#### **➤ Coloration des coupes**

Les coupes sont colorées au vert de méthyl pendant 5 à 10 mn. Elles sont ensuite rincées puis soumises à la coloration au rouge Congo pendant 5 à 10 mn. Les coupes les plus minces sont sélectionnées et observées au microscope optique au G : 40\*10.

➤ **Détection d'amidon dans les coupes histologiques de la plante étudiée**

Détacher les feuilles et les tiges, les décolorer par de l'éthanol bouillant pendant 5 minutes, les recouvrir de lugol (réactif spécifique de l'amidon) dans une boîte de Pétri et observer au microscope optique.

➤ **Préparation de Soluté de Lugol**

- Iodure de potassium : 10 g
- Eau distillée : 100 ml
- Iode : 5 g

Dissoudre 10 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau distillée, ajouter peu à peu 5 g d'iode sans cesser d'agiter le mélange puis filtrer et conserver dans une bouteille en verre fumé sombre bien fermée.

**3. Réaction générales de caractérisation (screening phyto-chimique)**

- **Test des alcaloïdes**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 1 ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par 0,5 ml de réactif de Mayer, l'autre par 0,5 ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune –clair respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

➤ **Réactif de Mayer**

Il est préparé à partir de deux solutions :

Solution A : 1,358 g de chlorure de mercure  $Hg Cl_2$  sont dissous dans 60 ml d'eau distillé.

Solution B : 5 g d'iode de potassium  $K I$  sont dissous dans 10 ml d'eau distillé ; les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

➤ **Réactif de Wagner**

2 g de  $K I$  et 1,27 g d'Iode sont dissous dans 75 ml d'eau distillée, puis ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

- **Test des saponosides : Test de mousse**

Dans un tube à essai, introduire 10 ml d'extrait à tester et agité pendant quelque secondes puis laissé au repos pendant 15 min. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition

d'une mousse stable, persistante plus que 5 min, si la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm le résultat est positif.

- **Test des flavonoïdes**

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rouge ou jaune se développe après 3 minutes.

- **Test des Tanins**

A 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de Fe Cl<sub>3</sub> à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre (tanins cachectiques) ou bleu-noirâtre (tanins galliques).

- **Test des coumarines**

Les coumarines ont été mises en évidence dans par la réaction sur le cycle lactonique.

Dans 2 tubes à essai, sont introduits 2 ml de solution éthanolique obtenue à partir de chaque résidu. Dans un des tubes à essai, sont additionnés 0,5 ml de NaOH à 10%, puis les tubes à essai sont chauffés au bain-marie jusqu'à ébullition. Après refroidissement, 4 ml d'eau distillée sont rajoutés dans chaque tube à essai. Si le liquide du tube à essai dans lequel l'on a ajouté la solution alcaline est transparente ou plus transparente par rapport au liquide du tube à essai témoin (sans solution alcaline), alors la réaction est positive. En acidifiant la solution transparente avec quelques gouttes de HCl concentré, elle perd sa coloration jaune, se trouble ou il se forme un précipité.

- **Test des stérols et tri-terpènes**

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydride acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques .

- **Test des anthocyanes**

Un volume de 2 ml d'extrait est additionné à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition 1 ml d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes.

- **Test d'amidon**

On chauffe 2.5 ml de l'extrait avec 5 ml d'une solution de Na OH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé.

- **Test des quinones**

Les quinones ont été mises en évidence dans l'extrait par le réactif de Borntraeger. Un aliquote de résidu dissout dans 5 ml de HCl dilué au 1/5, est chauffée au bain-marie bouillant pendant 30 min, puis extraite avec 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> après refroidissement. À la phase organique, sont additionnés 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH diluée à 50%. L'apparition d'une teinte allant du rouge au violet indique une réaction positive.

- **Test des composés réducteurs**

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1 ml réactif B), incuber l'ensemble pendant 8 min dans un bain marie bouillants. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

➤ **Liqueur de Fehling**

- Fehling A : dissoudre 3.5 g de sulfate de cuivre penta hydraté CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O dans 50 ml d'eau distillée.
- Fehling B : dissoudre 6.5 g d'ammoniaque NH<sub>4</sub>OH, 17.3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 35 ml d'eau distillé puis compléter le volume à 50 ml.

- **Test des composées Cyano-génétiques**

Les hétérosides cyano-génétiques sont également des composés réducteurs souvent présents dans les plantes.

➤ **Principe**

En présence d'un alcali ou d'une base, l'acide picrique mis en présence d'HCN donne une coloration rouge sang intense due à la formation d'un acide, l'acide isopurpurique.

- **Protocole opératoire**

Trois grammes de matériel végétal frais sont mouillés avec quelques gouttes de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) dans un tube à essai, où est insérée une bandelette de papier filtre imprégnée de picrate de sodium. Le tube est alors placé au bain-marie à 35° C pendant 3 heures. Un virage

au rouge de la bandelette indique la présence des composés cyano-génétiques (par production de HCN).

➤ **Préparation de papier picro –sodé**

Plonger les bandes de papier filtre dans une solution aqueuse d'acide picrique à 1% (préparer à chaud) .Les faire sécher à l'abri de la lumière sur papier buvard .Les tremper ensuite dans une solution à 10% de carbonate de sodium, puis les sécher comme précédemment.

**4. Préparation de Bouillon nutritif (BN)**

Le bouillon nutritif contient exactement les mêmes constituants que la gélose nutritive, excepté le fait qu'on n'ajoute pas d'agar puisque c'est un milieu liquide. Il est donc constitué de :

-2.5 g extrait de levure

-2.5 g de peptone

-2.5 g de NaCl

-500 ml d'eau distillée

-PH= 7.2

On incube le BN à 121 °C pendant 20 min.

**5. Préparation du milieu LB**

Pour la préparation de 1 litre de LB

➤ Préparer les ingrédients suivants :

-10 g de peptone

-5 g d'extrait de levure

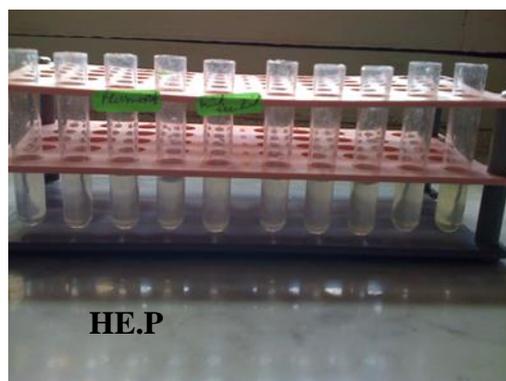
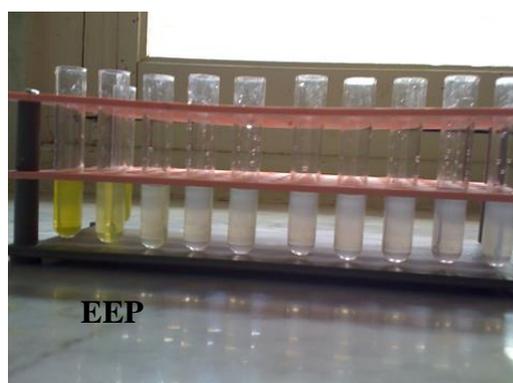
-10 g de NaCl

Verser le tout dans ~800 ml d'eau distillée ou déminéralisée puis ajouter de manière précise avec une éprouvette graduée de l'eau distillé pour atteindre un total de 1 litre. Autoclaver à 121°C / 15 min. Après refroidissement, agiter le flacon pour s'assurer du mélange et le milieu LB est prêt à l'emploi.

## 6. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans EEP et HE.P

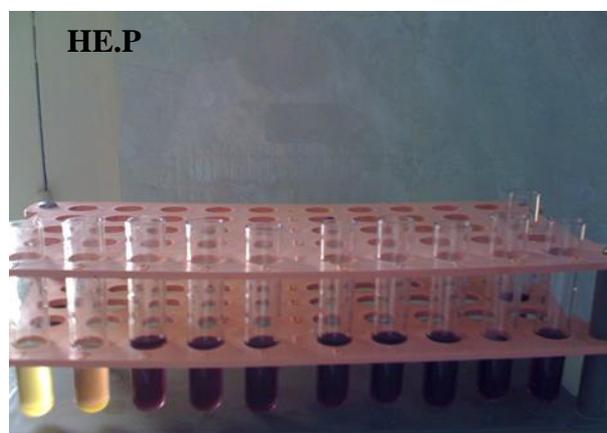
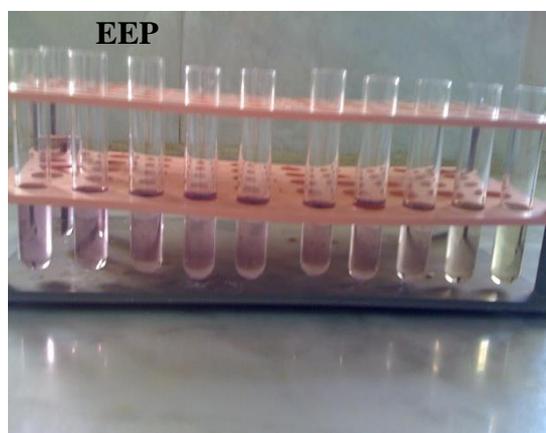


**Figure 1 :** Dosage des polyphénols totaux dans EEP et HE.P



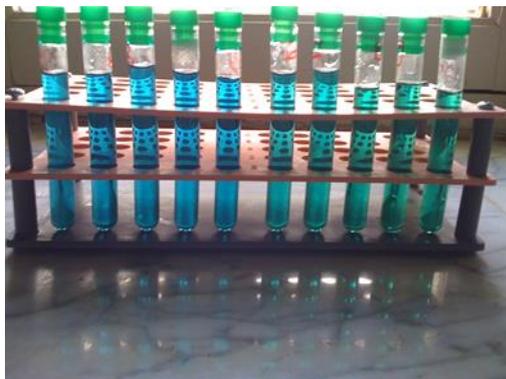
**Figure 2 :** Dosage des flavonoïdes dans EEP et HE.P

## 7. Activité anti-oxydante (Test DPPH)



**Figure 3 :** Virage de couleur violet sombre vers le jaune pâle

## 8. Activité anti-oxydante (Test de FRAP)

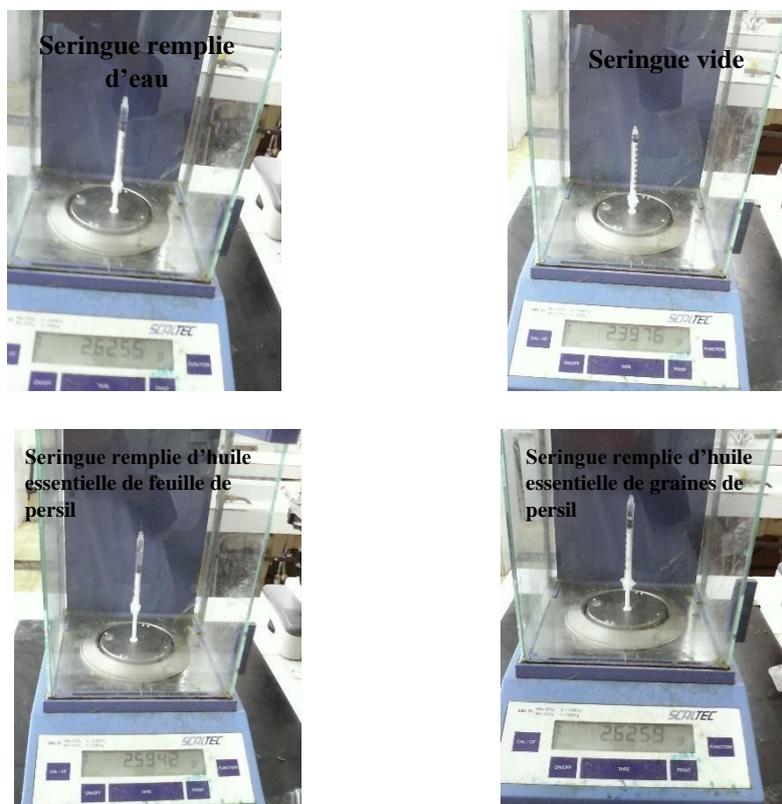


**Figure 4 :** Test de FRAP pour l'acide ascorbique



**Figure 5 :** Virage de couleur de jaune au vert

## 9. Caractéristiques physiques des huiles essentielles de *Petroselinum crispum*



**Figure 6 :** Mesure de la densité



**Figure 7 :** Détermination du pH de l'huile essentielle des graines de *Petroselinum crispum*



**Figure 8 :** Détermination du pH de l'huile essentielle des feuilles de *Petroselinum crispum*



**Figure 9 :** Détermination de pouvoir rotatoire des huiles essentielles des graines et feuilles de *Petroselinum crispum*

## Liste des communications

- **Wassila Lansari**, Abdelkrim Berroukche, Hafsa Dellaoui, Hadj Fidah ,Karima Grel ,Aouad Rarah (2018). Charagterisation of bioactive compounds in South –Western Algeria Perslay samples . 3<sup>èmes</sup> JNMC &FMC . Ain –Témouchent du 19 au 20 octobre 2018.
- Abdelkrim Berroukche , Mohamed Terras , Abdelatif Filali ,Hafsa Dellaoui , **Wassila Lansari** , Mustapha Brahimi (2018).The preventive effects of Myrtus communis aqueous extract leaves on anthropometric , biochemical and haematological status in rats exposed to Cypermrthrin .Toulouse , France le 3juillet 2018 .
- **Wassila Lansari**, Abdelkrim Berroukche, Hafsa Dellaoui, Hadj Fidah , Karima Grel ,Aouad Rarah (2018).Screening phytochimique , les composées bioactifs et potenyiel antimicrobien de la plante *Petroselinum crispum* (2018) . 3<sup>èmes</sup> JNMC &FMC . Ain –Témouchent du 19 au 20 octobre 2018.
- **Wassila Lansari**, Abdelkrim Berroukche, Hafsa Dellaoui, Hadj Fidah , Karima Grel ,Aouad Rarah (2018).Amelioration Effects of Petroselinum crispum Extract on Copper –induced Hepatotoxicity and Neurotoxicity in Experimental Animals .Ain –Témouchent du 19 au 20 octobre 2018.
- **Wassila Lansari**, Amara Sabrina, Abdelkrim Berroukche, Smahi Houria .(2016). Le potentiel probiotique des souches isolées à partir de différents laits du territoire algérien « des souches déjà isolées et pure sur les rats Wistars », Saida le 10 Mars 2016.
- **Wassila Lansari**, Abdelkrim Berroukche, Hafsa Dellaoui ,Houria Smahi .(2018). Phytochemical, Bioactives Compounds and anti- microbial potentials of *Petroselinum crispum*.11 ème Onzième congrès de l'AMPOREC, Oran du 13 au 14 Avril 2018.
- Hafsa Delloui, Abdelkrim Berroukche, Mohamed Terras, Labani A, Denai Imene , **Wassila Lansari** ( 2017).Carracterisation of bioactive compounds in South –Western Algeria propolis samples .VII<sup>ème</sup> Journées Scientifiques de la faculté des sciences et de la vie .Mostaganem du 26 au 27 avril 2017.
- Houria Semahi , Djellel Eddine Adli, Abdelkrim Ammam , Karima Grel, Miloud Slimani , Hadj Fidah , Hafsa Dellaoui , **Wassila Lansari** (2018).Activité Antioxydante et composition chimique de l'huile essentielle ectraite des graines de Foeniculum Vulgare Mill de la région de Saida . Quatrième journée scientifique des géosciences de l'environnement. JSGE4, Saida le 26 avril 2018.

# ***Petroselinum crispum* (Parsley) essential oil preventive effects on copper-induced hematological disruption in rat**

Wassila Lansari<sup>1</sup>, Abdelkrim Berroukche<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Bio-Toxicology, Pharmacognosy and Biological Valorization of Plants, Biology Department, Faculty of Science, Tahar-Moulay University, Saida 20000, Algeria.

<sup>2</sup>Research Laboratory of Water Resources and Environment, Biology Department, Faculty of Science, Tahar-Moulay University, Saida 20000, Algeria.

\*Corresponding author: Abdelkrim Berroukche (Email: kerroum1967@yahoo.fr / Tel: 00213555972162)

## **Abstract**

Copper (Cu), an essential transitional metal, acting as cofactors in enzyme-catalyzed reactions. It could be toxic to biological systems. *Petroselinum crispum* has a positive impact on human health due to its richness in vitamins and bioactive compounds. This study aimed to assess the preventive effects of parsley oil (PO) on copper sulfate induced haematological disruption in rats. PO were obtained by hydro-distillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *In vivo* study was carried out, during 8 weeks, on twenty eight male rats divided into four groups. Group (1): animals received daily, by oral route, copper sulfate in drinking water (2000 ppm), group (2): rats were orally administrated with PO (0.42 mg/kg /day), group (3): animals received in the same conditions PO and orally copper sulfate and group (4) was kept as normal control. PO was rich in Pinene (37.83 % ) followed by Apiol (15.40 %), Allyl tetramethoxybenzene (14.72 %),  $\beta$ -Phellandrene (8.11 %), Bis(2-ethylhexyl) phthalate (7.47 %), Myristicin( 7.46 %), trans- $\beta$ -Ocimene(2.70 %),  $\beta$ -Myrcene(1.00 %),  $\gamma$ -Terpinene(0.57 %). Haematological study showed that Copper induced an increase in blood platelets, a decrease in red blood cells, hemoglobin and hematocrit compared to control. Copper generated a macrocytic anemia and jaundice characterized by a decrease in hematological parameters whereas it was reported an increase in mean cell volume suggesting a compensatory response to the anemia by the bone marrow showed that anemia. Parsley oil displayed preventive effects against Cu toxicity in animal model. Therefore, parsley oil may have a chelating effect on Cu showing less toxicity.

**Keywords:** Copper; *Petroselinum crispum*; Haematological disruption; Essential oils.

## **INTRODUCTION**

Herbal remedies are used world-wide to alleviate symptoms and ailments, to treat illnesses, and to promote overall wellness. An estimated 60 % of the world's population used medicinal plants (Astin ,1998). Parsley (*Petroselinum crispum*) is a herb native to the Mediterranean area. Parsley, member of the Umbelliferae family, has been employed in the food, pharmaceutical, perfume, and cosmetics industries (Lopez *et al.* ,1999) . *P. crispum*, belonged to Apiaceae, is an important dietary source of vitamins and trace elements which could decrease the risks of Cd toxicity (Zhai *et al.*, 2015). Parsley has been reported to have beneficial effects such as antimicrobial, antianemic, anticoagulant, antihyperlipidemic, antihepatotoxic ,antioxidant activities and laxative (Wong and Kitts, 2006; Baytop ,1984 ; Ozturk *et al.*,1991 ; Nielsen *et al.*,1999 ; Kreydiyyeh *et al.*, 2001). Parsley also is used to treat arterial hypertension, diabetes, cardiac and renal diseases (Eddouks *et al.*, 2002 ; Jouad *et al.*, 2001; Ozsoy-Sacan *et al.*, 2006). Parsley's compounds including ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, coumarins, apiole, various terpenoid compounds, phenyl propanoids, phthalides, furanocoumarins, and tocopherol,

were chemically investigated (Tunali *et al.*, 1999). Parsley leave extracts scavenge free radicals which induced membrane oxidation (Fejes *et al.*, 2000; Wong and Kitts, 2006). whether administration of parsley oil, with its antioxidant activity, could protect against CDDP-induced hepato-cardiotoxicity (Abdellatif *et al.*, 2017). Cu, as trace-element, is necessary for metabolic functions and enzyme activities (Goyer, 1991; Babaei *et al.*, 2012). Cu, at high level, is toxic for plants and animals. Cu could induce reactive oxygen species (ROS) generation resulting in cellular damages as DNA damage, lipid peroxidation and protein modification. Adequate Cu nutrition is critical during pregnancy and lactation for normal infant development (Espin *et al.*, 2014). Cu metabolism disorders lead to severe metabolic syndromes, such as Menkes disease or Wilson's disease (Lorincz, 2018). Thus, Cu homeostasis regulation, maintained by mechanisms involving uptake, transport, storage, and excretion is required (Laloti *et al.*, 2009). Cu levels are mainly modulated by the liver tissue. In acute toxicity, albumin and ceruloplasmin bind exceeded Cu. Liver is the main site accumulating Cu through a large ingestion (Saravu *et al.*, 2007). High stored hepatic Cu may result in hepatocellular necrosis and consequently Cu was released into the blood producing hemolysis, jaundice, and renal insufficiency (Underwood and Suttle, 1999). Hemolytic anemia may be directly caused by erythrocyte membrane damage (Chuttani *et al.*, 1965) or indirectly by Cu-mediated inhibition of enzymes involved in fighting oxidative agent stress (Walsh *et al.*, 1977; Wahal *et al.*, 1976). Cu is also found in the nervous system at 70  $\mu\text{M}$  in the cerebrospinal fluid and 200  $\mu\text{M}$  in the synaptic cleft (Mathie *et al.*, 2006). Chelating agents, as zinc, are effective treatments against Cu toxicity through complexed glutathione synthesis (Sears, 2013). Developing countries are using natural herbal medicines. Due to economic conditions and availability, plants are the main source of phyto-compounds used to treat infectious diseases. In literature, data about protective effects of parsley against copper toxicity on hematological traits are still limited. In the present study, we investigated the hypothesis that parsley oil may protect against Cu-induced pathological changes in animal model.

## **METHODS**

### **Identification and essential oil extraction**

*Petroselinum crispum*, known as parsley, belonged to family Apiaceae (alt. Umbelliferae). The origin of parsley is from Mediterranean region, but today it is cultivated anywhere in the world. Botanic identification was performed by taxonomist Professor Pedro Sánchez, Botany Department, University of Murcia, Spain. Essential oils from seeds of *Petroselinum crispum* obtained by hydro-distillation, filtered and stored in the dark at 4°C until analysis.

### **Essential oil extraction**

For the extraction of essential oils from seeds of *Petroselinum crispum* by hydrodistillation under optimal operating conditions, a quantity of 75g of parsley was added to 500 ml of distilled water in a 2-liter flask. The set was placed in a balloon heater attached to a refrigerator to ensure condensation of essential oils for 3 hours. At the end of the distillation, two phases were observed, an aqueous phase (aromatic water) and an organic phase (essential oil), less dense than water. The essential oil was collected, and stored in sealed vials in the dark, at 4°C, until used.

### **Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) analysis**

Analysis of the essential oil was done using Agilent 6890 gas chromatography equipped with an Agilent mass spectrometric detector, with a BR-5MS fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thicknesses). It was programmed from 50°C (15min) to 250°C at 2°C/min to 250°C (10 min) with He carrier gas at a flow rate of 0.8 mL.min<sup>-1</sup> and injector heater 250°C. The MS conditions were EI source, electron energy 70 eV and source temperature 250°C. Acquisition mass range, m/z = 10-600. The constituents of aromatic oil

were identified by matching their relative retention times and mass spectra with those of NIST 11 mass spectral database.

### **Animals**

Experiments were carried out on 28 adult male Wistar rats at weights ranging from 105 to 121 g. Animals were housed under standard environmental conditions at 22 °C with 12:12 h light–dark cycle and maintained with free access to water ad libitum (Carbone and Austin, 2016). Their body weight was measured every week. The experimental period was 60 days. The animals were divided into four groups with 7 rats in each group. In Group 1, rats received orally copper in drinking water at a concentration of 2000 ppm. In Group 2, rats received orally a dose of PO at 0.42 ml/ kg body weight per day. In Group 3, rats received a mixture (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O and PO) in the same experimental conditions. In Group 4, normal rats received a distilled water and standard diet, served as control group. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the UFPE (Process No. 012974) in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Carbone and Austin, 2016).

### **Hematological study**

Blood samples were collected using the method retro-orbital sinus in rats. This method used plastic syringes in EDTA tube for determination of Red blood cells count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), packed cell volume (PCV), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelets count and white blood cells count (WBCs) in all preserved and control groups. Hematology samples were analyzed with automated Hematology Analyzer, MINDRAY BC – 2800 , right after drawing blood.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean ± SD. The level of significance was expressed as extremely highly significant at  $P < 0.001$ , highly significant at  $P < 0.01$ , and significant at  $P < 0.05$ . Statistical evaluation was performed by Tow-way ANOVA followed by the Tukey's t-test for multiple comparisons. All analyses were made with the statistical software SigmaPlot (version 11.0).

## **RESULTS**

GC–MS analysis of parsley essential oil led to the detection of 18 compounds with 98.06 % of the total oil as shown in Table 1. Pinene was the main compound (37.83 % ) followed by Apiol (15.40 % ) , Allyltetramethoxybenzene (14.72 % ) , β-Phellandrene (8.11 % ) , Bis(2-ethylhexyl) phthalate (7.47 % ), Myristicin (7.46 % ), trans-β-Ocimene (2.70 % ), β-Myrcene (1.00 % ) and γ-Terpinene (0.57 % ). In the current study, it has been investigated the dampening effect of Cu toxicity on the body weight increase in rats exposed to Cu and the possible recovering capacity of parsley oil against this effect. As shown in Table 2, animals were monitored and controlled during the experimental period. CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O induced significant decrease in body weight in animals of Group 1 compared to normal control rats (Group 4). Loss body weight was respectively illustrated by the following values 81.78±0.218 vs. 253.95± 0.654g whereas animals treated simultaneously with the parsley oil and CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Group 3) showed a significant increase in body weight compared to experiment animals administrated with CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Group 1) and their body weights were respectively 90±0.48 vs 81.78±0.21 g. In this study, in Parsley oil treated group, the body weights were significant decreased compared to normal control rats (Group 4). In the current study, Cu treatment induced deleterious changes in blood formula. The result of WBC count are listed in Table 3. It showed a significant decrease in Cu intoxicated group 1 compared with controls (group 4). While there was a significant increase of these values in (PO and CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O)

treated animals (group 3) compared to copper intoxicated animals (group1). There was a significant increase of these values in PO treated rats (group 2) compared to control. The current results clearly indicated that treatment with  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  induced a significant decrease in values of RBC compared to control. Conversely, (PO and Cu) exposed group showed a significant increase in the values of RBC compared to the  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  exposed animals (group 1). There was a significant increase of these values in PO treated animals (group 2) compared to control. The results of hemoglobin (Hb) showed there was significant decrease in values in Cu group compared to control .In comparison to the control group, a significant increase in values of Hb has been detected in PO rats (group 2). While there was a significant increase in values of (PO and Cu) treated animals (group 3) compared to Cu exposed animals (group 1). The results of Hematocrit showed that the intoxicated  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  group induced a significant decrease compared to those values of control group. Conversely, PO treated rats (group 2) has showed a significant increase in the values of Hematocrit compared to the control group. The study showed that there are significant increase in values of Hematocrit in group 3 compared to group 1 .Furthermore, there were no significant differences between control group, group 2 and group 3 in the mean values of MCV, MCH and MCHC (Table 3). The result of intoxicated copper group showed that there are significant increase in values of MCV compared to control indicating macrocytic anemia with no significant decrease in values of MCH and MCHC. The result of Red Cell Distribution Width are summarized in Table 3. It showed a significant increase in  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  intoxicated group compared to control while there was a significant decrease of these values in (PO and Cu) treated rats compared to Cu intoxicated group. The results of platelets count also have been shown in Table 3. The values showed a significant decrease in intoxicated Cu group compared to the control. Conversely, group 2 showed a significant increase in these values with significant increase in group 3 compared to group 1. The present study showed that the values of lymphocytes were significantly decrease in exposed Cu group compared to control. Treatment with parsley oil induced a significant decrease in the rate of lymphocytes compared to the control group. Whereas a significant increase was found in animals treated with (PO and Cu) compared to group 1. Various hematological tests were applied to determine anemia in chronic  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  treatment. The results showed a significant decrease in RBC counts, haematocrit (PCV) values with marked decrease in Hb level suggesting a chronic blood loss due to hemolytic anemia.

## **DISCUSSION**

Parsley's composition agrees to results reported by authors (Kurowska and Galazka, 2006). These results disagree with those obtained by other researchers (Linde et al., 2016). They found that apiole was the predominant compound of the essential oil (50.3 %) followed by  $\beta$ -phellandrene and myristicin (14.6 and 14.0 %). In recent paper, it has been studied the chemical composition of parsley essence purchased in Egyptian market ( Louis. K, Tadros et al., 2017). It revealed main compounds such as apiol , di-n-octyl phthalate ,myristicin, carvone and 1,4-benzenediamine. Other Research work showed that myristicin was the main bioactive molecule in parsley's essential oil (Craft et al., 2016). *In vivo* studies showed that heavy metals were usually associated with weight loss. In the current study, it was reported increased Cu toxicity effects on the rat's body weight and the possible preventive effects of parsley essential oil in partial recovering of this anthropometric parameter. Cu is needed for the normal physiological functions. The severe Cu exposure increased adverse toxic effects

such as hemolysis, gastrointestinal distress and hepato-renal damage (Galhardi *et al.*, 2004). In the present study, Cu administration showed a significant body weight loss. These results are similar to outcomes found by Mohammed *et al.*, 2014. The loss body weight may be caused by an improper metabolism probably due to Cu toxicity ulcerative enteritis. Cu is oxidizing irritant to intestinal mucosa. These results are in accordance with those reported by Mohammed (2014) and Al-Ghamdi (2016), suggested in one hand a significant decrease in body weight of fetus, aged of one to seven days, treated with Cu and in another hand a significant decrease in body weight of fetuses treated with Cu and parsley essential oil at ages of one, seven and fifteen days. Decreased in body weight of animals treated with parsley seeds may be contributed to diuretic, hypoglycemic and laxative effects of this medicinal plant (Darias *et al.*, 2001; Yanardag *et al.*, 2003; Kreydiyyeh *et al.*, 2001). In contrast, it was found a significant increase in the body weight in rats treated with parsley oil extract (Rashwan, 2012). In the current study, a lowering body weight of Cu treated animals was also observed in the results reported by A.A. Rajiha *et al.*, 2013. The present investigation was carried out to explore the possible ameliorative role of parsley on Cu toxicity-induced in rats. Studies suggested that phenolic compounds and flavonoids are main secondary plant metabolites with bioactive potential attributed to their antioxidant activities (Kaur and Kapoor, 2002). These results also exhibited a significant increase in MCV due to Cu toxicity associated with the hemolytic anemia and reticulocytosis. This result is similar to the result of Aboushouk (2018). Studies suggested Cu was involved in RBCs damage, a marked reduction in the deformability of the RBCs as well as marked increases in membrane permeability and osmotic fragility (Adams *et al.* 1979). Liver tissue lost its ability to sequester Cu. Free Cu, in hepatocytes, lead to hepatic necrosis. Copper triggered a hemolytic anemia and induced RBCs cell membranes damage (Mendel *et al.*, 2007). Hemolysis process was result of Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition under the Cu effect and consequently decreased the NADPH rate in RBCs (Sarvu *et al.*, 2007). RDW is elevated in accordance with variation in red cell size (aniso-macrocytosis) in chronic CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O treatment. The blood formula, in animals treated with Cu, showed a decrease in WBCs count mainly due to Lymphocytopenia. Al-Daraji, 2012, reported that parsley treatment recorded the highest WBC count and lymphocyte rate. It was also noticed that H/L ratio was significantly higher in group treated with Cu compared to parsley treated groups. These findings are in agreement with the results of the present study A. Al- Naimi Rajiha (2013), reported a significant decrease in lymphocytes and thrombocytopenia in treated groups with different doses of Cu (8 mg/kg.bw and 40 mg/kg.bw). Secondary thrombocytopenia resulting from poisoning cause interference with clotting and hemorrhage (Bedard *et al.*, 2000).

Parsley oil (PO) treatment, as alternative medicine, in Cu-exposed animals significantly enhanced hematological parameters. This result may be explained that parsley was an appropriate source of iron, beta-carotene and vitamin C for enhancement of general health status (Ragab *et al.*, 2010). This may be due to the significant effect of parsley in the excretion of heavy metals from body (Darias *et al.*, 2001). These findings may be attributed to the potential activities of *Petroselinum crispum*'s oil bioactive compounds (myristicin and apiol) in scavenging of ROS generated by the oxidative stress induced by Cu toxicity (Zhang *et al.*, 2006). Findings obtained are supported by those of Hedaya, 2006 and EL-Sarha *et al.*, 2009, that suggested parsley seeds extracts (200 mg/kg) administrated to rats and goat respectively for 12 weeks increased hemoglobin and red blood cell count due to antioxidant compounds especially limonene, beta-carotene and coumarin. Gadi *et al.*, 2009, revealed that parsley acted to prevent platelet aggregation and thus was used to prevent heart disease and arterial hypertension. Parsley contains volatile oils such as albiol, merstisinwabinin and also high

levels of vitamins, iron, calcium, potassium and sulfur. parsley oil rich in vitamins C and E, which reduces the congenital and drug-induced valbroat in mice embryos (Reyhaneh, 2012). However, it was known that parsley alleviate stress via its role in enhancing general health status and immunity (Richmond *et al.*, 2000). Zheng *et al.*, 1992, reported that parsley is rich in myristicin with a high activity inducing the detoxifying enzyme glutathione S-transferase (GST) in the liver in mice. In the same way, Nielsen *et al.*, 1999, reported that human treated with parsley oil resulted in increased levels of glutathione reductase and antioxidant activity. Chlorinated compound, in parsley, displayed significant biological activities such as antibiotic, antitumour, antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, antihepatotoxic and antioxidant activities (Holst *et al.*.,2000 ; Kery *et al.*.,2001 ; Al-Howiriny *et al.*., 2003).

### **CONCLUSION**

According to the results obtained, *Petroselinum crispum* oils occurred as antioxidant and anti-inflammatory. As supplement, this herb may be an effective and preventive treatment against Copper-induced hematological disturbance in rats. Furthermore, parsley oil's compounds may have chelating effects on copper generating a complex with a less toxicity. These outcomes concluded that *Petroselinum crispum* oil is an excellent candidate for clinical drug development.

### **Acknowledgement**

The authors would like to thank to personal from medical biology laboratories of University Hospital of Tlemcen and Hospital of Saida for their help and assistance. Authors confirm that this research did not receive any specific grant from funding agencies in the public or commercial sectors.

### **Conflict of Interest**

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## REFERENCES

- Abdellatief AS, Galal AA , Farouk MS, Abdel-Daim MM. 2017. Ameliorative Effect of parsley oil on cisplatin-induced hepato- cardiotoxicity: A biochemical, histopathological, and immunohistochemical study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86: 482–491.
- Aboushouk Samah SO, Asmaa A, Samar SE. 2018. The Potential Ameliorative Effect of Nano-Zinc and Zinc Against Copper Hepatorenal Toxicosis in Rats. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 57 (1): 148-160.
- Adams KF, Johnson G, Hornowski KE, Lineberger TH. 1979. The effect of Copper on erythrocytes deformability: a possible mechanism of hemolysis in acute copper intoxication .
- Al-Daraji HJ, Al-Hassani AS, Al-Mashadani HA, Al-Hayani WK, Mirza HA. 2012. The Influence of Parsley (*Petroselinum crispum*) as Feed Additive on Hematological Traits of Local Iraqi Geese .*Advances in Nutrition Research*, 1(1): 1-5.
- Al-Ghamdi FAM, AL-Amri ASM. 2016. The protective role of parsley oil on kidney of the albino rat offsprings against toxicity of Etoricoxib drug (Arcoxia). *Life Science Journal*, 13 (9).
- Al-Howiriny TA, Al-Sohaibani MO, Al-Tahir KH and Rafatullah S. 2003. Preliminary evaluation of the anti – inflammatory and anti–hepatotoxic activities of parsley (*Petroselinum crispum*) in rats. *J Nat Remed*, 3: 54-62 .
- Al- Naimi AR, Al-Tayar Nibras A, Alsoufi Layth AM, Al-Taae HY. 2013. Eman. Hematological and Biochemical evaluation after different orally doses of Copper sulfate in rats. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 38(1): 83 - 91.
- Astin JA. 1998. Why patients use alternative medicine; results of a national study. *JAMA*, 279: 1548 – 1553.
- Babaei H, Kheirandish R, Ebrahimi L. 2012. The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (3): 1615-1619.
- Baytop T. 1984. *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*, Istanbul University Yayinlari, No. 3255.
- Bedard K, Fuentealba IC, Cribb A. 2000. The Long Evans Cinnamon (LEC) rat develops hepatocellular damage in the absence of antimicrosomal antibodies, 146:101-109.
- Campanella L, Bonanni A, Favero G, Tomassetti M. 2003. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. *Analytical and Biochemistry*, 375: 1011-1016.
- Carbone L, Austin J. 2016. Pain and laboratory animals: publication practices for better data reproducibility and better animal welfare. *PLoS One*, 11(5): e0155001.
- Chuttani HK, Gupta PS, Gulati S, Gupta DN. 1965. Acute Copper Sulfate Poisoning. *Am. J. Med.*, 39:849-54.

- Craft Jonathan D, Setzer WN. 2017. The volatile components of parsley, *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss American Journal of Essential Oils and Natural Products, 5(1): 27-33.
- Darias V, Martin-Herrera D, Abdala S, Fuente D. 2001. Plants used in urinary pathologies in the Canary islands". *Pharm Biol*; 39: 170-180.
- Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol*. 82: 97–103.
- EL-Sarha AL, Hassan HY, Said DM. 2009. Haemato-biochemical change induced by oral administration of *Petroselinum crispum* to goats". Master thesis, Faculty of veterinary medicine. Zagazig university, Egypt.
- Espín S, Martínez-López E, Jiménez P, María-Mojica P, García-Fernández AJ. 2014. Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environ Res*, 129: 59-68.
- Fejes S, Blazovics A, Lemberkovics E, Petri G, Szoke E, Kery A. 2000. Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracted fractions of parsley. *Acta-Alimentaria*, 29: 81-87.
- Gadi D, Mohamed B, Mohammed A, et al. 2009. Parsley extract inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 (1):170-174.
- Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, et al. 2004. Toxicity of copper intake : lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food. Chem. Toxicol*. 42 (12): 2053–2060.
- Goyer RA. 1991. Toxic effects of metals. In: Amdur MO, Doull J, Klaasen CD (eds.). *Casarett and Doull's Toxicology*. 4th ed., New York: Pergamon Press, pp. 653-655.
- Hedaya S. 2006. Effect of *Petroselinum crispum* Extract on Some Heamatological and Biochemical Parameters in Rats". *Alex. J. Vet. Sci*; 11(2),95-99.
- Holst PB and KC Engvild. 2000. Natural chlorinated compounds. 17th Danish plant Protection Conference Overview / environment / weeds. DJF – Rapport, Markbrng. No. 23, 87-95.
- Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol*, 77: 17582.
- Kaur C. and Kapoor HC. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. of Food Sc. and Tech.*, 37: 153-161
- Kery AA, Blazovics S, Fejes E, et al. 2001. Antioxidant activity of medicinal plants used in phototherapy. *Intern J Horti Sci*, 7: 28-35

Kreydiyyeh SI, Usta J, Kaouk I. 2001. The mechanism underlying the laxative properties of parsley extract. *J. of Phytomed*, 8(5): 382-388.

Kurowska A and Galazka I. 2006. Essential oil composition of the parsley seed of cultivars marketed in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*; 21: 143–147.

Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval V. 2009. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci*, 14: 4878–4903.

Linde GA, Gazim ZC, Cardoso BK, et al. 2016. Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil. *Genetics and Molecular Research*, 15 (3):15038538.

Lopez MG, Sanchez-Mendoza IR, Ochoa-Alejo N. (1999): Comparative study of volatile components and fatty acids of plants and in vitro cultures of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill) nym ex hill). *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3292-3296.

Lorincz MT. 2018. Wilson disease and related copper disorders. *Handb Clin Neurol*, 147:279– 292.

Louis K, Tadros HH, El-Rafey HA, et al. 2017. Phenolic Profile, Essential oil Composition, Purification of Kaempferol 3- arabinofuranoside and Antimicrobial Activity of Parsley Cultivated in Dakhalia Governorate. *J.Agric.Chem.and Biotechn., Mansoura Univ .Vol. 8(7): 183 – 189 .*

Mathie A, Sutton GL, Clark CE, Veale EL. 2006. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol Ther*, 111: 567-583.

Mohammed SA, Bakery HH, Abou Salem ME, Nabila AM, Elham AE. 2014. Hepatotoxic effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives in albino rats. *Benha.Vet.Med.J. 27(1):146-156.*

Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N. 2007. Haemolytic crisis in sheep as a result of chronic exposure to copper. *Pol. J. Vet. Sci.* 10 (1): 51-56.

Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandstrom B. 1999. Effect of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British J. Nutrition*, 81: 447-455.

Ozsoy-Sacan O, Yanardag R, Orak H, Ozgey Y, Yarat A, Tunali T. 2006. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 104 (1-2): 175-181.

Ozturk Y, Baser CHK, Aydin S. 1991. Hepatoprotective ( antihepatotoxic) plants in Turkey. *Proceedings of the 9th Symposium on Plant Drugs, Eskisehir, Turkey, May: 40-50.*

Kreydiyyeh SI, Usta J. and Kaouk I. 2001. The mechanism underlying the laxative properties of parsley extract. *J. of Phytomed*; 8(5): 382-388.

Ragab MS, Magda RA and Farhat GS. 2010. Effect of molukhyia or parsley feeding on carcass characteristic, glutathione peroxidase enzyme activity and meat quality of two broiler strains. *Egypt Poult Sci*, 30 (1): 353-389.

Rashwan NM. 2012. Biological Study on the Effect of Arginine Parsley and on Renal Toxicity in Rats". World Journal of Medical Sciences; 7 (4): 264-269.

Reyhaneh S. 2012. Antioxidant activity exhibited by medicinal plants, vegetables and fruits from North of Iran. Research Signpost Trivandrum: 205-236.

Richmond, ACK and SML Mackley. 2000. Herbs and Spices. 2nd ED. Loren Books Annes Publishing Inc., London, UK.

Sarvu K, Jose J. Bhat MN, Jimmy B, Shastry BA. 2007. Acute ingestion of copper sulphate: A review on its clinical manifestations and management. Ind. J. Crit. Care. Med. 11: 74-80.

Sears ME. 2013. Chelation: Harnessing and enhancing heavy metal detoxification - A review. Scientific World Journal, 1-13.

Tunali T, Yarat A, Yanardag R, Ozcelik F, Ozsoy O, Ergenekon G, et al.1999. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) on the skin of STZ induced diabetic rats. Phytother. Res. 13: 138-141

Underwood EJ, Suttle NF.1999. The mineral nutrition of livestock. 3rd ed. Wallingford, U.K.: CABI Publishing.

Wahal PK, Mehrotro MP, Kishore B, Patney NL, Mital VP, Hazra DK.1976. Study of whole blood, red cell and plasma copper levels in acute Copper Sulfate poisoning and their relationship with complication and prognosis. J. Assoc. Physician India, 24: 153-158.

Walsh FM, Crosson FJ, Bayley M. 1977. Acute Copper intoxication. Am. J. Dis. Child., 131:149-51.

Wong PYY, Kitts DD. 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. Food Chemistry. 97 (3): 505–515.

Yanardag R, Bolkent S, Tabakoglu-Ogluz A, OzoySacan O.2003. Effects of *Petroselinum crispum* extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin induced diabetic rats. Biol Pharm Bull; 26: 1206-1210.

Zhai Q, Narbad A, Chen W. 2015. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. Nutrients. 7(1): 552-571.

Zhang H, Chen F, Wang X, Yao HY. 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Res Int.* 39: 833–839.

Zheng GQ, Kenney PM, Zhang J, Lam LK. 1992. Inhibition of benzo [a] pyrene – induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. *Carcinogenesis*, 13 (10): 1921-1923.

**Table 1.** Chemical compositions of *Petroselinum crispum* seeds essential oils

N°	Rt	Peak area (%)	Identified Compounds	Molecular Formula
1	7.213	0.506	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	7.468	2.702	trans-β-Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	7.714	17.979	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene Synonym : 1R-α-Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	8.319	0.481	Camphene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	10.323	19.854	β-Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	11.973	1.000	β-Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	15.037	0.129	o-Cymene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	15.586	8.115	β-Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
9	18.844	0.571	γ-Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	21.795	0.071	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- Synonym : p-Cymenene	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub>
11	30.803	0.565	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-carboxaldehyde, 6,6-dimethyl	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
12	49.584	0.174	E)-β-Farnesene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
13	50.667	0.147	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2α,4α,8αβ)]-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
14	53.360	7.462	1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)- Synonym : Myristicin	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
15	57.134	0.713	Carotol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
16	58.373	14.72	Benzene, 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)- Synonym : Allyltetramethoxybenzene	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>
17	62.624	15.401	Apiol	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
18	100.980	7.479	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
Total identified	98.069			

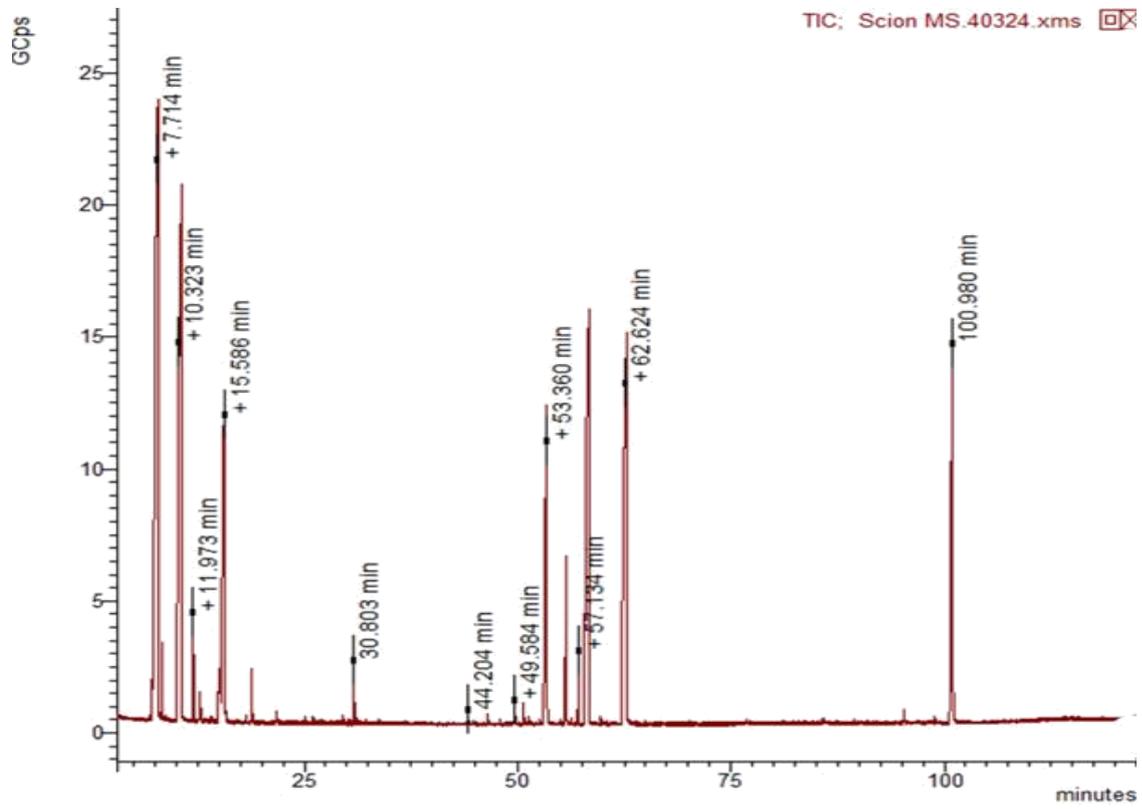
**Table 2.** Effect of parsley treatment on the animal's body weight change.

	Initial weight	Final weight
Group 1	118.61±0.975	81.78±0.218*
Group2	121.74±0.308	122.51±0.617*
Group3	105.98±0.308	90±0.487 <sup>#</sup>
Group4	121.03±0.690	253.95±0.654

**Table 3.** Effect of copper sulphate (CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O), Parslay oil administration alone or in combination for eight weeks on the hematological parameters in male rats Wistar.

Parameters	Groups			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
RBC	4.78±0.0037*	7.75±0.0021*	6.88±0.0048 <sup>#</sup>	6.01±0.0057
Hb	8.72±0.0061*	14.38±0.0061*	13.65±0.0021 <sup>#</sup>	11.9±0.0308
PCV	28.08±2.6457*	42.79±0.0021*	39.14±0.0087 <sup>#</sup>	34.36±0.0061
MCV	58.69±0.0021*	55.18±0.0021	56.89±0.0021	57.09±0.1393
MCH	18.23±0.0092	19.13±2.1854	19.84±0.0087	19.81±0.0037
MCMH	31.07±0.0216	34.66±2.1832	34.86±0.0021	34.65±0.0037
RDW	13.6±0.0487*	11.77±0.0021*	13.5±0.0218 <sup>#</sup>	12.52±0.0089
Platelets count (mm <sup>-3</sup> )	57000±285.7142*	582000±218.2178*	349000±218.2178 <sup>#</sup>	500000±4364.3578
WBC	2160±2.1821*	8420±4.3643*	3850±3.7796 <sup>#</sup>	8230±5.7735
Lymphocytes (%)	49.6±0.0308*	56±0.6172*	67.8±0.0690 <sup>#</sup>	58.5±0.0487

Red blood cells count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), packed cell volume (PCV), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), white blood cells count (WBC). Mean±Standard deviation (SD) (N = 7). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, for CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Group 1), Parsley Oil (Group 2) and parsley Oil + CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O treated groups (Group 3) versus control (Group 4).<sup>#</sup>P < 0.05 Significantly different from copper-intoxicated group.



**Figure 1.** Chromatogram in electronic impact of parsley essential oil.



