



Année Universitaire : 2014-2015

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Etude phytochimique et évaluation de différentes
activités des extraits de *Pimpinella anisum***

Présenté par:

LEMJALLAD Lamiaa

Encadré par:

- ✓ Pr. Y. KANDRI RODI
- ✓ Pr. F. OUAZZANI

Soutenu Le 24 juin 2015 devant le jury composé de:

- Pr. A. BOUKIR
- Pr. A. BENTAMA
- Pr. Y. KANDRI RODI
- Pr. F. OUAZZANI

Stage effectué à : Laboratoire De Chimie Organique Appliquée LCAO



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom : LEMJALLAD Lamiaa

Année Universitaire : 2014 / 2015

Titre: Etude phytochimique et évaluation de différentes activités des extraits de *Pimpinella anisum*

Résumé

Pimpinella anisum est une plante médicinale appartenant à la famille des Apiacées, elle est une des plus anciennes plantes médicinales. Les extraits ont été obtenus par l'épuisement du même matériel végétal ; en premier lieu nous avons extrait l'huile essentielle, par la suite nous avons soumis la masse végétale résiduelle de l'hydrodistillation à des extractions successives par appareillage « Soxhlet » en utilisant différents solvants avec polarité décroissante (Eau, Méthanol, Acétone et Acétates d'éthyle). Les rendements sont respectivement : $(4,17 \pm 0,07 \%)$ – $(8,23 \pm 0,28\%)$ – $(0,60 \pm 0,06\%)$ – $(0,64 \pm 0,12\%)$. A titre de comparaison, on a fait une extraction méthanolique de la matière végétale fraîche avec un rendement de $11,76 \pm 0,56\%$. La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 10,71 – 28,34 – 1,06 et 0,93 (mg Gal eq /g d'anis) dans les extraits aqueux, du méthanol, d'acétone et d'acétate d'éthyle respectivement. La teneur de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais en composés phénolique est de 36,98(mg Gal eq /g d'anis). Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leur teneur est de 8,89 – 25,92 – 0,74 et 0,77 (mg Gal eq /g d'anis) dans les extraits aqueux, du méthanol, d'acétone et d'acétate d'éthyle respectivement. Mais la teneur en flavonoïdes pour la matière végétale fraîche est de 31,80(mg Gal eq /g d'anis).

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH. La valeur IC_{50} a été estimée à 658 – 648 – 16,75 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait méthanolique issu du résidu par épuisement, l'extrait méthanolique de la matière fraîche et l'huile essentielle respectivement.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur la souche bactérienne E.Coli. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par l'huile essentielle de l'anis vert sur *Escherichia Coli* est de 0,35%

Mots clés : *Pimpinella anisum*, huile essentielle, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne.



Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr. Y. KANDRI RODI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et Mr. F. OUAZZANI, Professeur et chef du département de chimie à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, leur disponibilité, leurs conseils précieux et leur confiance qu'ils m'ont accordé.

Je tiens à remercier Mr. A. BOUKIR, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

J'exprime des vifs remerciements à Mr. A. BENTAMA, Professeur et Directeur du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour avoir accepté être membre du jury et examiné ce travail.

Mes remerciements vont aussi à Mr. SAYAH étudiant en doctorat à la Faculté des Sciences et Techniques pour avoir partagé avec moi sa passion pour les plantes et pour son encadrement.

Mes remerciements vont également à tous mes enseignants, pour leur information et leur aide durant ces deux années de Master.

Je dédie ce travail à mes parents et je les remercie du fond du cœur pour leur amour et pour leur soutien indéfectible, tout au long de toutes ces années d'études.



Liste des figures

Figure 1 : Plante de la famille des Apiaceae	14
Figure 2 : Montage d'extraction par la technique d'hydrodistillation.....	18
Figure 3 : Montage d'extraction des H.E. par l'entraînement à la vapeur d'eau	19
Figure 4 : Schéma explicatif de l'hydrodiffusion.....	19
Figure 5 : Schéma du principe d'extraction par CO ₂ supercritique [22].....	20
Figure 6 : Montage de l'extraction assistée par micro-ondes [22].....	21
Figure 7 : Unité isoprénique	22
Figure 8: Structure de quelques composés monoterpéniques	23
Figure 9: Exemple de composés sesquiterpéniques	24
Figure 10: Structures de composés diterpéniques	25
Figure 11: Exemple de composés phénylpropanoïdes	25
Figure 12 : Mécanisme de la formation de l'acide mévalonique	26
Figure 13 : Mécanisme de la formation de l'unité IPP	27
Figure 14 : Mécanisme du couplage de unités DMAPP et IPP pour former les monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes	28
Figure 15 : Squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée.....	31
Figure 16 : Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes [3].	35
Figure 17: Dispositif expérimental de l'hydrodistillation avec l'appareil Dean Starck	38
Figure 18 : Schéma explicatif de l'extracteur soxhlet	40
Figure 19 : Schéma général des extractions de l'anis vert par épuisement avec solvants	41
Figure 20 : Schéma explicatif de l'extraction méthanolique de l'anis vert frais.....	42
Figure 21 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant AH [28]	43
Figure 22 : Dilution des différents extraits de l'anis vert dans DMSO.....	44
Figure 23 : Spectrophotomètre utilisé	44
Figure 24 : Préparation des dilutions de l'acide gallique pour la réalisation de la courbe standard des polyphénols totaux.	46
Figure 25 : Dilutions de l'acide gallique	46
Figure 26 : Préparation des dilutions de la quercétine pour la réalisation de la courbe standard des flavonoïdes.....	47
Figure 27 : Dilutions de la quercétine	47
Figure 28 : Schéma explicatif du repiquage par la méthode des stries	50



Figure 29 : Image de l'huile essentielle de Pimpinella anisum.....	52
Figure 30 : Chromatographe obtenu par analyse CG/MS de l'huile essentielle de pimpinella anisum	53
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents extraits de l'anis vert en fonction de la concentration	58
Figure 32 : Graphique qui représente l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de Pimpinella anisum en fonction de la concentration	59
Figure 33 : Maximum d'inhibition de la DPPH par les extraits méthanolique et de l'huile essentielle	60
Figure 34 : Solution du DPPH.....	60
Figure 35 : Différentes dilutions des extraits des huiles essentielles	61
Figure 36 : Différentes dilutions des extraits par le méthanol	61
Figure 37 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	62
Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	64
Figure 39 : Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovine	65



Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des différentes parties de la plante de Pimpinella anisum	14
Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle de pimpinella anisum	53
Tableau 3 : Pourcentage des différents classe de l'huile essentielle	54
Tableau 4 : La composition de l'huile essentielle de l'anis vert de différentes régions du monde	54
Tableau 5 : Résultats de l'extrait aqueux de Pimpinella anisum.....	55
Tableau 6 : Résultats de l'extrait méthanolique à partir de Pimpinella anisum fraiche.....	55
Tableau 7 : Résultats de l'extraction par épuisement de Pimpinella anisum par les solvants organiques	56
Tableau 8 : Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de l'anis vert	57
Tableau 9: Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de Pimpinella anisum.....	59
Tableau 10 : Concentrations en polyphénols des extraits par épuisement de l'anis	62
Tableau 11 : Teneur en composés phénolique des graines fraîches d'anis	63
Tableau 12 : Concentrations en flavonoïdes des extraits par épuisement de l'anis	64
Tableau 13 : Concentrations en polyphénols de l'extrait méthanolique de l'anis frais	65
Tableau 14 : Essai d'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'anis sur Escherichia Coli	66
Tableau 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Pimpinella anisum [45].	68



Liste des abréviations

A.A. : Activité antiradicalaire

Abs : l'absorbance

AFNOR : Association Française pour la Normalisation

AlCl₃ : Le chlorure d'aluminium

AMF : l'extrait méthanolique de l'anis vert frais

ATP : L'adénosine-5'-triphosphate

CI₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

CG : chromatographie en phase gazeuse

CMI : concentration minimale inhibitrice

d : la densité de l'anis vert

DMAPP : diméthylallylpyrophosphate

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAC : l'extrait de l'acétone

EAD : l'extrait d'acétate d'éthyle

EM : l'extrait méthanolique

FPP : farnésylpyrophosphate

GPP : géranylpyrophosphate

IPP : l'isopenténylpyrophosphate

L.B. : Luria-Bertani

mg Gal / g extrait : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids de l'extrait de la graine.

mg Gal /g d'anis : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids sec de la graine.

mg Qer / g extrait : Milligramme d'équivalent quercitine par gramme du poids de l'extrait de la graine.

mg Qer/ g d'anis : Milligramme d'équivalent quercitine par gramme du poids sec de la graine.

MVA : l'acide mévalonique

MS : spectroscopie de masse

NaNO₂ : Nitrite de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium



Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale

Première partie : Etude Bibliographique

I.	Généralités sur <i>Pimpinella anisum</i>	14
I.1.	Description botanique :	14
I.1.1.	Fleurs :	14
I.1.2.	Fruit :	15
I.1.3.	Tige :	15
I.2.	Classification scientifique de la plante :	15
I.3.	Origine et distribution :	15
I.4.	Composition de <i>Pimpinella anisum</i> :	15
I.5.	Utilisations de <i>Pimpinella anisum</i>	16
I.5.1.	Utilisations médicinales :	16
I.5.2.	Utilisations cosmétiques :	16
I.5.3.	Autres utilisations :	17
II.	Huile essentielle.....	17
II.1.	Définition de l'huile essentielle :	17
II.2.	Méthodes d'extraction des huiles essentielles :	17
II.2.1.	Expression à froid :	18
II.2.2.	Extraction par hydrodistillation :	18
II.2.3.	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :	18
II.2.4.	Hydrodiffusion :	19
II.2.5.	Extraction par gaz supercritique :	19
II.2.6.	Extraction par les corps gras :	20
II.2.7.	Extraction aux solvants volatils :	20
II.2.8.	Extraction assistée par micro-ondes :	21
II.3.	Techniques d'analyses et contrôle de la qualité des H.E.	21
II.4.	Composition :	22



II.4.1.	Terpènes :.....	22
II.4.2.	Groupe des phénylpropanoïdes :.....	25
II.5.	Biosynthèse :.....	26
II.5.1.	Synthèse de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) :	26
II.5.2.	Synthèse des terpènes :	27
II.6.	Notion de chémotype :	29
II.7.	Facteurs influençant la composition :.....	29
II.8.	Utilisations et propriétés des huiles essentielles de la plante :.....	29
II.8.1.	Utilisations	29
II.8.2.	Propriétés :	30
II.9.	Polyphénols :.....	30
II.10.	Flavonoïdes : abrégé de biochimie végétale.....	31
II.11.	Activité antioxydante :.....	34
II.12.	Activité antimicrobienne :	35
II.12.1.	Généralités :.....	35
II.12.2.	Culture des bactéries :	35
II.12.3.	Description de la bactérie Escherichia coli utilisée :.....	36

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

I.	Matière végétale :	38
II.	Taux d'humidité :	38
III.	Extraction des huiles essentielles :.....	38
III.1.	Calcul du rendement des huiles essentielles.....	39
III.2.	Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle :.....	39
IV.	Extrait aqueux :.....	39
V.	Extraction par solvants :	40
V.1.	Extraction par épuisement du résidu de l'hydrodistillation :	41
V.2.	Extraction méthanolique de l'anis vert frais :	42
VI.	Activité anti-oxydante (détermination du pouvoir anti-oxydant) :	43
VI.1.	Principe :.....	43
VI.2.	Mode opératoire :.....	44
VII.	Dosage des polyphénols :.....	45
VII.1.	Principe :.....	45



VII.2.	Mode opératoire :.....	45
VII.3.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique :.....	45
VIII.	Dosage des flavonoïdes :.....	46
VIII.1.	Mode opératoire :.....	47
VIII.2.	Courbe d'étalonnage de la quercétine :.....	47
IX.	Dosage des lipides :	48
X.	Dosage des protéines :	48
X.1.	Principe :	48
X.2.	Mode opératoire :	49
XI.	Activité antibactérienne de l'huile essentielle du <i>Pimpinella anisum</i> sur E.Coli. .	49
XI.1.	Matériel biologique :	49
XI.2.	Culture bactérienne et préparation de l'inoculum	49
XI.2.1.	Repiquage des bactéries :.....	49
XI.2.2.	Préparation de l'inoculum :	50
XI.3.	Evaluation de l'activité antibactérienne :	50
	51

Troisième partie : Résultats et Discussion

I.	Humidité :.....	52
II.	Extraction des huiles essentielles :	52
II.1.	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pimpinella anisum</i> :	52
III.	L'extrait aqueux :.....	55
IV.	Extraction par solvants organiques :.....	55
IV.1.	Extraction méthanolique :.....	55
IV.2.	Extraction par épuisement :	56
V.	Activité antiradicalaire :	57
V.1.	L'activité antiradicalaire des différents extraits de <i>Pimpinella anisum</i> :	57
V.2.	Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de <i>Pimpinella anisum</i> :	59
V.3.	Comparaison de l'activité antiradicalaire :.....	60
VI.	Dosage des polyphénols :.....	61
VI.1.	Dosage des polyphénols des extraits par épuisement :.....	61
VI.2.	Dosage des polyphénols de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais :	63
VII.	Dosage des flavonoïdes :	63



VII.1.	Dosage des flavonoïdes des extraits par épuisement :.....	64
VII.2.	Dosage des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais :.....	65
VIII.	Dosage des protéines :.....	65
IX.	Dosage des lipides :	66
X.	Activité antibactérienne :.....	66
	Conclusion	
	Perspective	
	Bibliographie	



Introduction générale

Les plantes médicinales sont une source large des molécules bioactives nouvelles avec potentielle thérapeutique [1]. Une des originalités majeures de plantes médicinales réside dans leur capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules bioactives utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [2].

Les métabolites secondaires sont accumulées dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante [3]. Ils sont des produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes [2].

Les épices sont classées parmi les plantes médicinales, ces épices sont des parties de plantes aromatiques à la saveur forte ou des préparations, notamment des mélanges faits à partir de ces plantes, utilisées en petite quantité en cuisine comme conservateur, assaisonnement ou colorant. Elles peuvent provenir de différentes parties de la plante : l'écorce, exemple de la cannelle, de feuilles, le cas de la mélisse, de rhizome exemple du curcuma et du gingembre ou de fruits comme pour le piment, le fenouil, l'aneth et la moutarde, de grains comme pour la coriandre et l'anis vert [2].

Le présent travail a pour objectif :

- Etudier l'aspect botanique, thérapeutique et d'intégrer les propriétés médicinales de l'anis vert.
- Extraire les molécules bioactives de l'anis vert, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques surtout l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.



Première partie : Etude Bibliographique



I. Généralités sur *Pimpinella anisum*

L'anis (*Pimpinella anisum* L.) est une épice importante et une plante médicinale annuelle qui appartient à la famille des Apiaceae [4], elle portait, anciennement, le nom d'Ombellifère en référence à son inflorescence bien caractéristique [5].



Figure 1 : Plante de la famille des Apiaceae

Les Apiacées comprennent 300-455 genres et 3.000-3750 espèces, elles se répartissent dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord [6]. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres [7].

Les membres de cette famille incluent les légumes (carotte, panais, céleri) et les condiments (coriandre, l'anis, le carvi, le cumin, le persil et l'aneth) et ils ont des saveurs distinctives qui sont en grande partie dues à divers composés volatils dans les fruits et les feuilles. Ils ont, non seulement, une vaste utilisation culinaire, mais aussi de larges applications dans la médecine traditionnelle[6].

I.1. Description botanique :

L'anis (*Pimpinella anisum* L.) est une plante herbacée du genre *Pimpinella* qui contient 23 espèces. Il est cultivée comme plante condimentaire pour ses graines aromatiques[8]. La plante est de 50 à 60 cm de haut [9] et voici une description des différentes parties de la plante :

Tableau 1 : Description des différentes parties de la plante de Pimpinella anisum

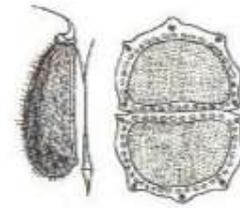
<p>I.1.1. Fleurs :</p> <p>Les fleurs sont petites de 3 mm de diamètre[10] blanches, radiales, disposées en ombelles composées de 7 à 15 rayons [7].</p>	 <p><i>La fleur de l'anis vert</i></p>
--	--



I.1.2. Fruit :

Le fruit de l'anis est l'un des plus anciens épices, Il est caractérisé par son agréable odeur et son goût sucré lorsqu'on le mâche [10].

Le fruits de l'anis vert est d'une couleur grise verdâtre au brun, ovoïde , et légèrement comprimé latéralement , allant de 2 à 5 mm de longueur [9].



Fruit du Pimpinella anisum de la famille des Apiacées [7]

I.1.3. Tige :

Sa tige s'élève à la hauteur d'environ 3,25 cm [11], elle est cylindrique, creuse, finement striée et ramifiée au sommet [7].



La tige de l'anis vert

I.2. Classification scientifique de la plante :

La classification de la plante de pimpinellea anisum [2] :

Règne Plantae

Division Magnoliophyta

Classe Magnoliopsida

Ordre Apiales

Famille Apiaceae (ombellifère)

Genre Pimpinella anisum L.



I.3. Origine et distribution :

L'anis vert (*Pimpinella anisum* L.) est une plante originaire du Moyen-Orient et elle est connue depuis l'Egypte ancienne [8]. Elle pousse dans la Turquie, l'Iran, l'Inde, l'Egypte et d'autres nombreuses régions chaudes du monde [12].

I.4. Composition de *Pimpinella anisum* :

Le rendement de l'anis peut sensiblement varier selon les conditions écologiques telles que la température, les précipitations et la fertilité des sols. Des études antérieures ont montré que



les effets de l'espacement de ligne, l'approvisionnement en eau, la fertilisation, l'époque des semis, la densité de semis sur le rendement des graines d'anis et de leurs qualités [13].

Les graines de *pimpinella anisum* contient [14] :

- 1,5 à 6% de l'huile essentielle
- 10 à 20 % de l'huile fixe
- 18% des protéines

I.5. Utilisations de *Pimpinella anisum*

Pimpinella anisum est considérée comme une matière première naturelle et utilisée dans le domaine pharmaceutique, la parfumerie, les industries alimentaires et cosmétiques[4].

I.5.1. Utilisations médicinales :

Pimpinella anisum est une des plus anciennes plantes à épices connue et elle a plusieurs effets thérapeutiques, en site parmi eux [12]:

- Propriétés digestifs :
 - Apéritif : en augmentant la digestibilité des nutriments par l'augmentation de la sécrétion d'enzymes digestibles et développement de l'activité hépatique [15].
- Gynécologique :
 - Augmenter la sécrétion de lait [14].
- Neurologique :
 - l'épilepsie[16].
 - Tranquillisant.
 - hypnotique [14].
- Trouble respiratoire :
 - Toux [17].
 - Anti-asthme [16].
 - Dyspnée (gêne respiratoire).
 - expectorant [14]

I.5.2. Utilisations cosmétiques :

- La parfumerie



- Aromatisant des produits cosmétiques tels que : les crèmes hydratantes, les crèmes solaires ...

I.5.3. Autres utilisations :

Industrie agro-alimentaire : L'anis vert est utilisé en tant qu'aromatisant et correcteur de goût pour les soupes, les gâteaux, les biscuits, en confiserie pour aromatiser les friandises et les sirops [18].

II. Huile essentielle

II.1. Définition de l'huile essentielle :

Sur les 800000 espèces végétales répertoriées dans le monde, seules 10% sont dites « aromatiques », c'est-à-dire renferment une essence. Cela fait tout de même 80000 plantes aromatiques, dont la plupart restent à étudier [19].

L'huile essentielle se retrouve dans les cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches (Myrtacées, Rutacées), dans des poils sécréteurs (Lamiacées) ou dans des canaux sécréteurs (Apiacées) [20]. L'huile essentielle ne contient pas de corps gras (lipides), elle est très volatile et marquée par une odeur caractéristique et forte [19].

La norme **AFNOR NF T 75-006 5FEVRIER 1998** a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

II.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont très variées, elles s'étalent des plus traditionnelles à celles qui font appel aux techniques récentes. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physicochimiques du produit voulu et son utilisation ultérieure. Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont voici les principales :



II.2.1. Expression à froid :

La technique d'extraction à froid est exclusivement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles des agrumes (orange, pamplemousse, mandarine...). Elle consiste à soumettre la substance végétale à une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique, ce qui nous permet d'obtenir une émulsion d'eau et de l'huile essentielle qui est récupérée après centrifugation et filtration[21].

II.2.2. Extraction par hydrodistillation :

Elle consiste à immerger le végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'huile libérée par le matériel végétal formant un mélange non miscible.. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyses, de réarrangements, d'arénisations, d'oxydations, d'isomérisations,...qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation de l'huile essentielle.

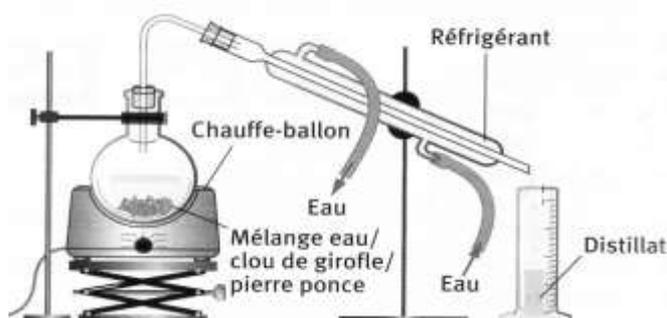


Figure 2 : Montage d'extraction par la technique d'hydrodistillation

II.2.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas. Contrairement à l'hydrodistillation, la matière végétale dans ce cas n'est pas en contact de l'eau. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'huile essentielle se libère du tissu végétal et se fait entraîner par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeur est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation.

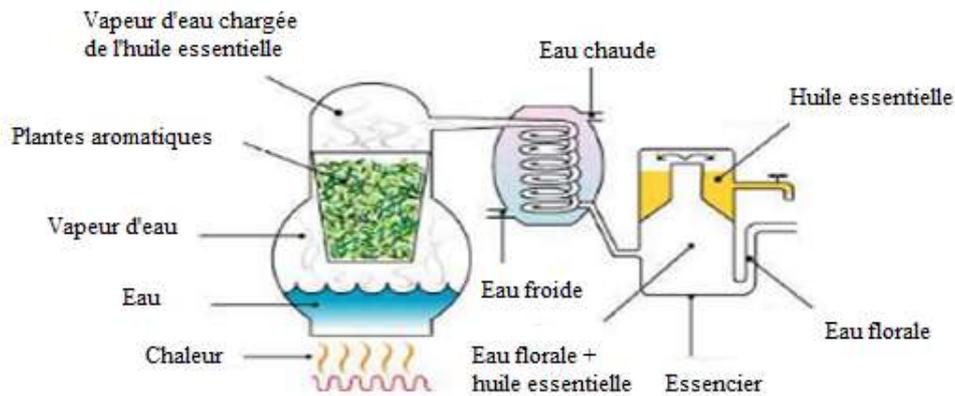


Figure 3 : Montage d'extraction des H.E. par l'entraînement à la vapeur d'eau

II.2.4. Hydrodiffusion :

Contrairement à la distillation à la vapeur, la vapeur injectée dans ce système est du haut de l'alambic vers le bas. Le mélange de vapeur-huile essentielle est condensé directement en dessous du support de la plante à travers un plateau perforé. Ce procédé permet de réduire la consommation en vapeur, réduire le temps de distillation et d'obtenir un meilleur rendement en comparaison avec distillation à la vapeur.

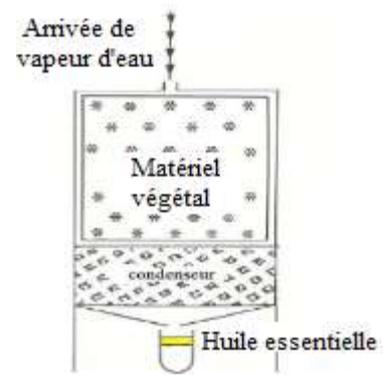


Figure 4 : Schéma explicatif de l'hydrodiffusion

II.2.5. Extraction par gaz supercritique :

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂. Il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux ; le CO₂ sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à son point critique alors qu'ils ne le sont pas à l'état gazeux. Les avantages de ce procédé est que le CO₂ est inerte chimiquement, naturel, non toxique et bon marché et facilement séparable de l'extrait. L'extraction au CO₂ est

supercritique, est une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives, cependant son installation reste coûteuse et l'appareillage est encore envahissant.

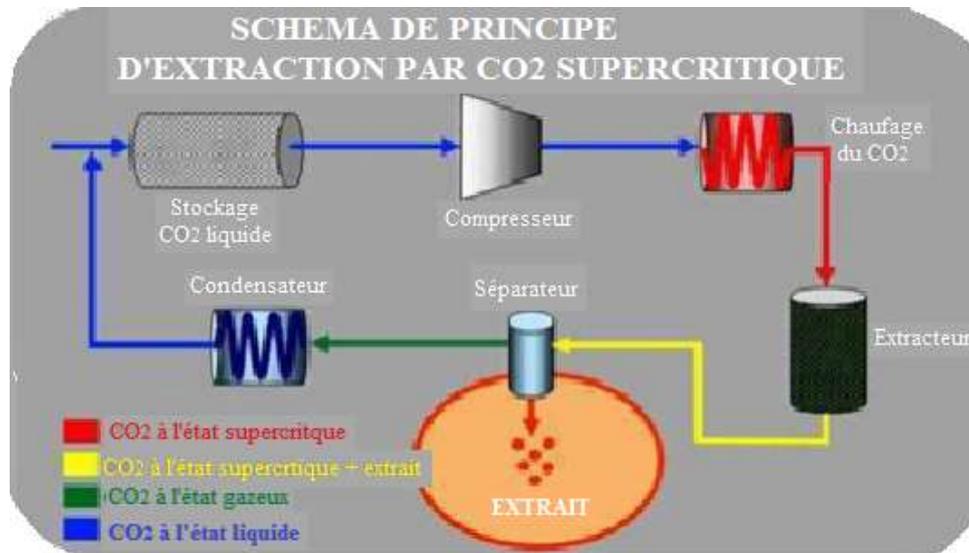


Figure 5 : Schéma du principe d'extraction par CO₂ supercritique [22]

II.2.6. Extraction par les corps gras :

La méthode d'extraction par le corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles des plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composés odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en molécules odorantes. Le produit obtenu est une pommade florale qu'est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite.

II.2.7. Extraction aux solvants volatils :

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre inconvénient de cette méthode, est leur manque de sélectivité ; de ce fait, de nombreuses substances lipophile (huiles fixes, phospholipide,



caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent être extraites dans le mélange pâteux ce qui impose une purification ultérieure.

II.2.8. Extraction assistée par micro-ondes :

La micro-onde agit sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde, et convertissent son énergie en chaleur. Dans une plante, les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau (les vacuoles, véritables réservoirs liquides des cellules), puis convertis en chaleur. Ils en résultent une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, et les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique, et l'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau.

L'avantage essentiel de ce procédé est de détruire, considérablement, la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et augmente le rendement d'extrait [22].

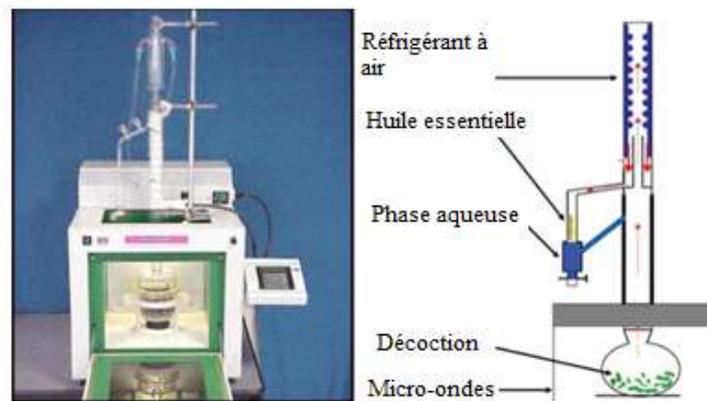


Figure 6 : Montage de l'extraction assistée par micro-ondes [22]

II.3. Techniques d'analyses et contrôle de la qualité des H.E.

En égard à l'importance industrielle des huiles essentielles, le contrôle de leur qualité s'impose depuis le producteur, en passant par l'industriel jusqu'au consommateur. Cette exigence se traduit nécessairement par l'établissement de normes de qualité, élaborées pour des considérations de santé et de sécurité dans différents domaines d'applications des huiles essentielles. Normalement, les normes de qualité sont établies par les instances gouvernementales et servent de référence. Dans le cas des huiles essentielles, ces normes ont été définies par l'Association Française de Normalisations (AFLOR) et "essential oils



association" (EOA). Ainsi l'analyse des huiles essentielles portent sur les caractéristiques et la composition chimique.

II.4. Composition :

Du point de vue chimique, les huiles essentielles représentent le groupe le plus hétérogène qui existe. On y trouve divers composés représentant un bon nombre de fonctions organiques (hydrocarbures, alcools, cétones, aldéhydes, esters et acides). Il est généralement admis que les constituants des huiles essentielles sont répartis en deux groupes provenant de deux voies de biosynthèse[20] :

II.4.1. Terpènes :

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène [C_5H_8], ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, l'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation [2].

La forme réactive de l'isoprène est l'isopentényle pyrophosphate (IPP), qui se transforme partiellement en diméthylallylpyrophosphate (ou DMAPP). Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranylpyrophosphate (ou GPP) précurseur des monoterpènes en C_{10} . Une deuxième molécule de IPP réagissent sur le GPP pour former farnésylpyrophosphate (ou FPP) précurseur des sesquiterpènes en C_{15} [20].

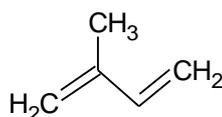


Figure 7 : Unité isoprénique

Le terme « terpénoïdes » désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Leur classification est basée sur le nombre des répétitions de l'unité de base isoprène en donnant des hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tetraterpènes (C_{40}) et polyterpènes[2].

Pour $n = 2$: les monoterpènes.



Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en C_{10} (oxygénés ou non), dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques [2] (Figure 8).

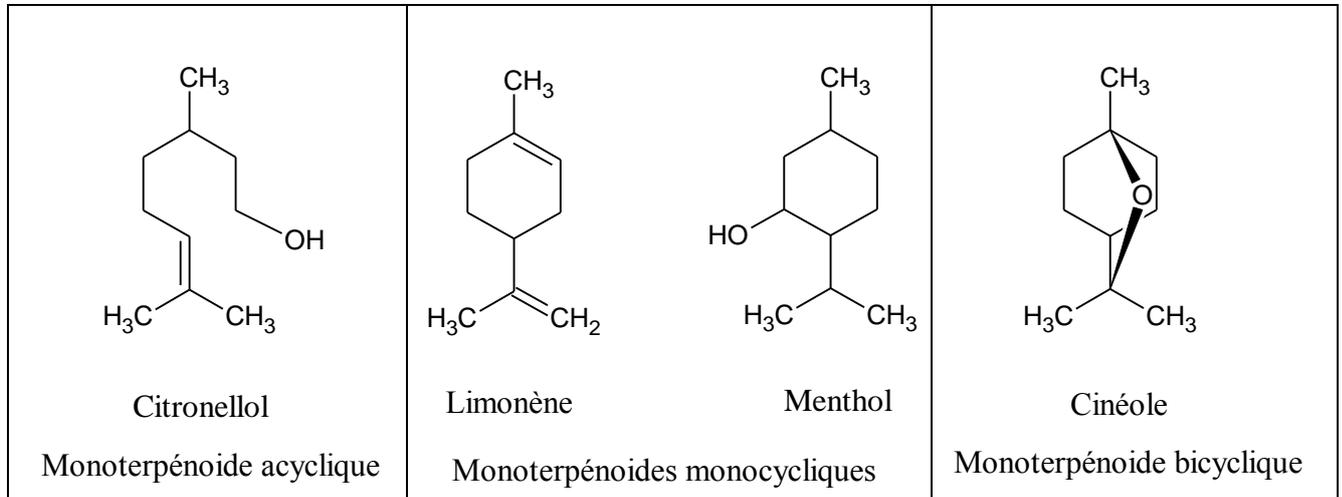
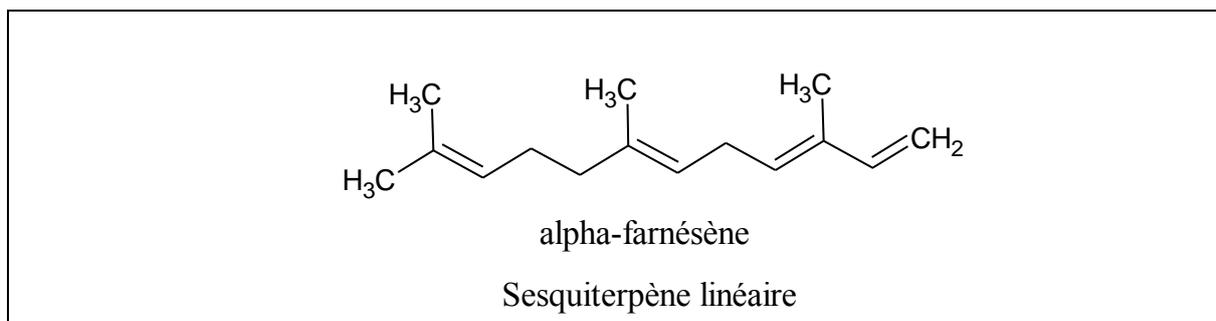


Figure 8: Structure de quelques composés monoterpéniques

Pour $n = 3$: les sesquiterpènes.

Ce sont des hydrocarbures en C_{15} (oxygénés ou non), soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des monoterpènes. Ils peuvent aussi être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques (Figure 9). Ils ne sont pas volatiles et leur structure casse à des températures élevées. Les monoterpènes sont avec les sesquiterpènes, les éléments principaux des huiles essentielles [2]. arnésèn



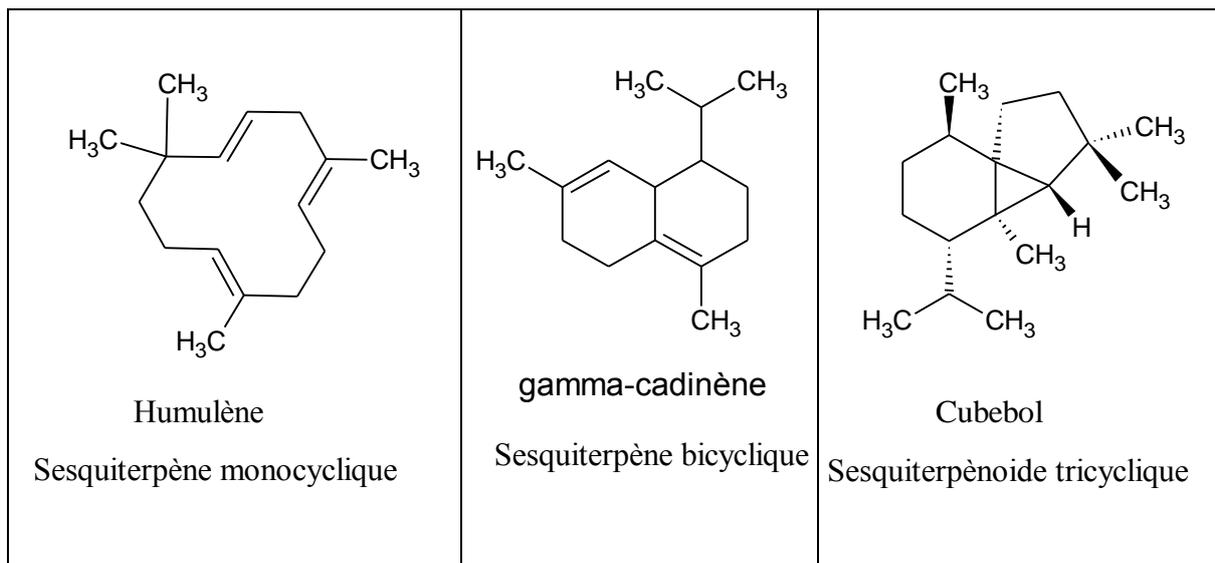
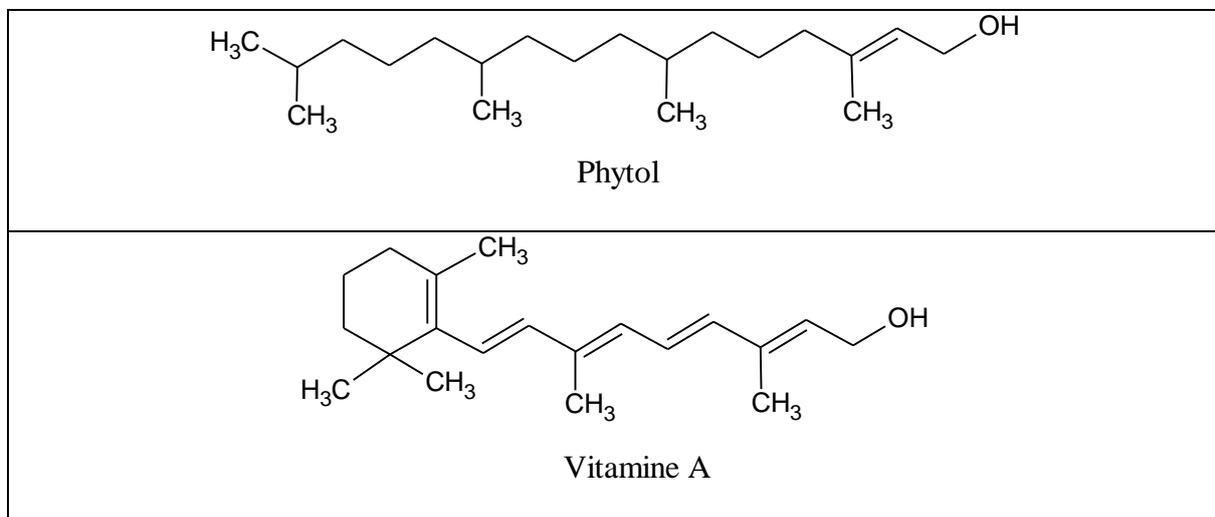


Figure 9: Exemple de composés sesquiterpéniques

Pour n = 4 : les diterpènes.

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C₂₀. Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines. Ils peuvent être acycliques, monocycliques comme la vitamine A, bicycliques comme le sclaréol ou tricycliques comme l'acide abiétique. La figure 10 ci-dessous rassemble les diterpènes cités :



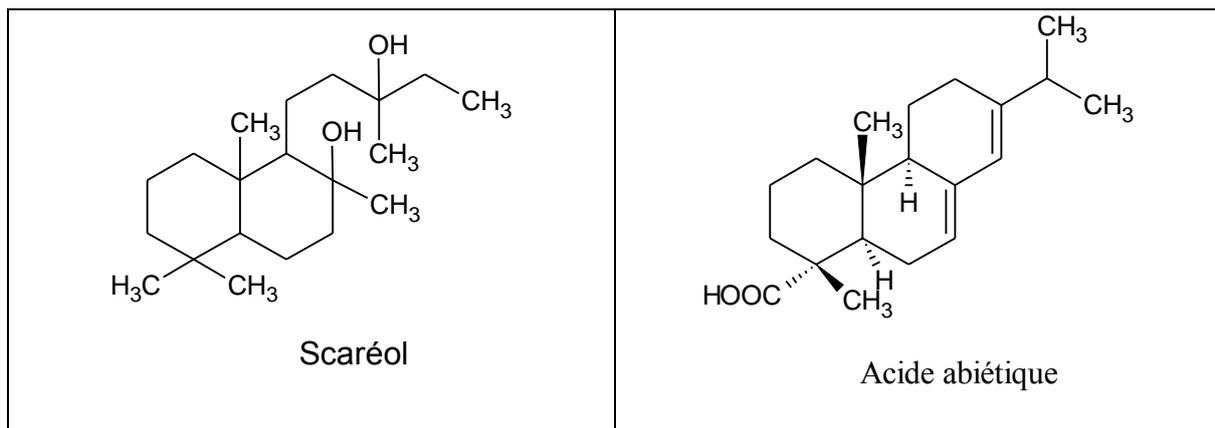


Figure 10: Structures de composés diterpéniques

On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phénylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote.

II.4.2. Groupe des phénylpropanoïdes :

Les huiles essentielles se composent de terpènes mais aussi de composés dérivés du phénylpropane. La voie des phénylpropanoïdes commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyruvate) et aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (Figure 11) (d'où son nom, voie des shikimates) et l'acide cinnamique. Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants: acides salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (estragole) ainsi que les coumarines,...[21]

Des exemples de composés dérivés du phénylpropane :

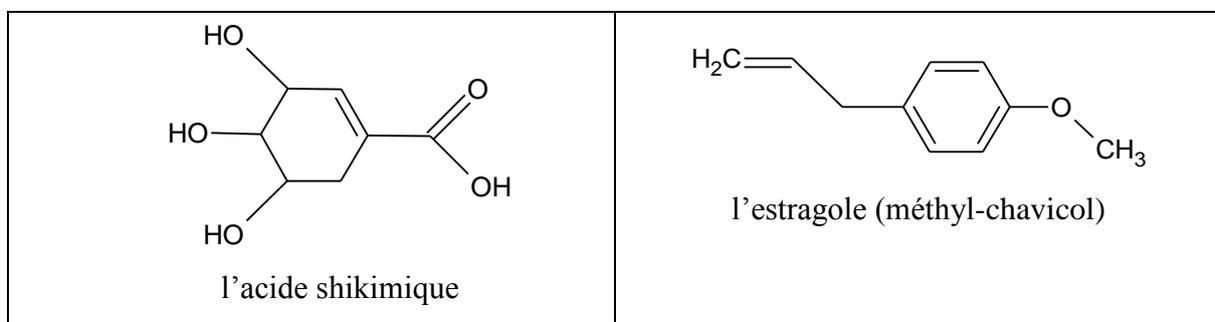


Figure 11: Exemple de composés phénylpropanoïdes



II.5. Biosynthèse :

La biosynthèse des végétaux fait intervenir l'eau et le dioxyde de carbone pour la formation de glycéraldéhyde $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{O})$ et de l'acide pyruvique $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{COOH}$ qui, à leur tour donne, après réaction avec l'acétyl-coenzyme A (methyl thioester de l'acide acétique), le méthyl-2 érythritol $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)-\text{CHO}$ et l'acide mévalonique $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH}$, qui est le véritable précurseur universel de tous les terpènes. Le produit final de cette série est l'isoprène (ou 2-méthylbutadiène) $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$.

II.5.1. Synthèse de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) :

IPP est l'unité biologique isoprénique à partir de laquelle se forment, par polymérisation et isomérisation, tous les terpénoïdes.

Deux molécules d'acétyl-CoA (a) réagissent sous l'influence d'une β -cétio-thiolase pour donner de l'acétoacétyl-CoA (b), lequel, en présence d'un enzyme condensant, fixe une troisième molécule d'acétyl-coA avec formation de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (c). La réduction du carboxyle combiné au CoA en alcool se produit ensuite en formant de l'acide mévalonique (MVA).

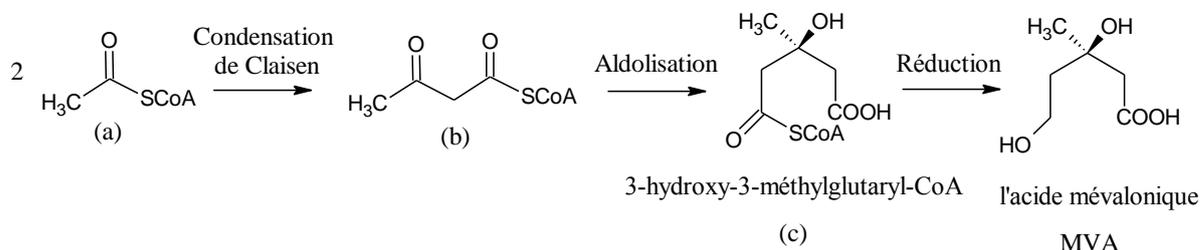


Figure 12 : Mécanisme de la formation de l'acide mévalonique

L'acide mévalonique est alors phosphorylé par l'ATP (L'adénosine-5'-triphosphate). Pour former l'isopentényle pyrophosphate (IPP) qui constitue l'unité isoprénique d'enchaînement : il s'isomérisé en diméthylallyle pyrophosphate (DMAPP) :

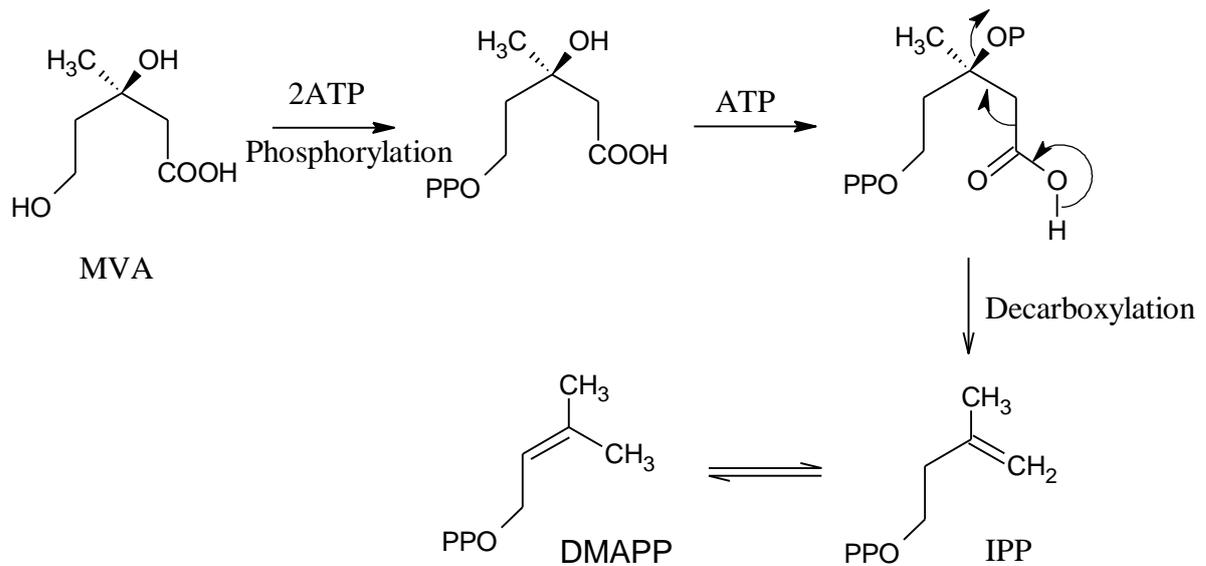


Figure 13 : Mécanisme de la formation de l'unité IPP

II.5.2. Synthèse des terpènes :

Le diméthylallyle pyrophosphate formé se condense avec une nouvelle molécule d'IPP, pour donner le :

- Géranyle pyrophosphate (GPP), précurseur des monoterpènes
- Farnésyle pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes
- Géranylgéranyle pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes
- Géranylfarnésyle pyrophosphate (GFPP), précurseur des sesterpènes

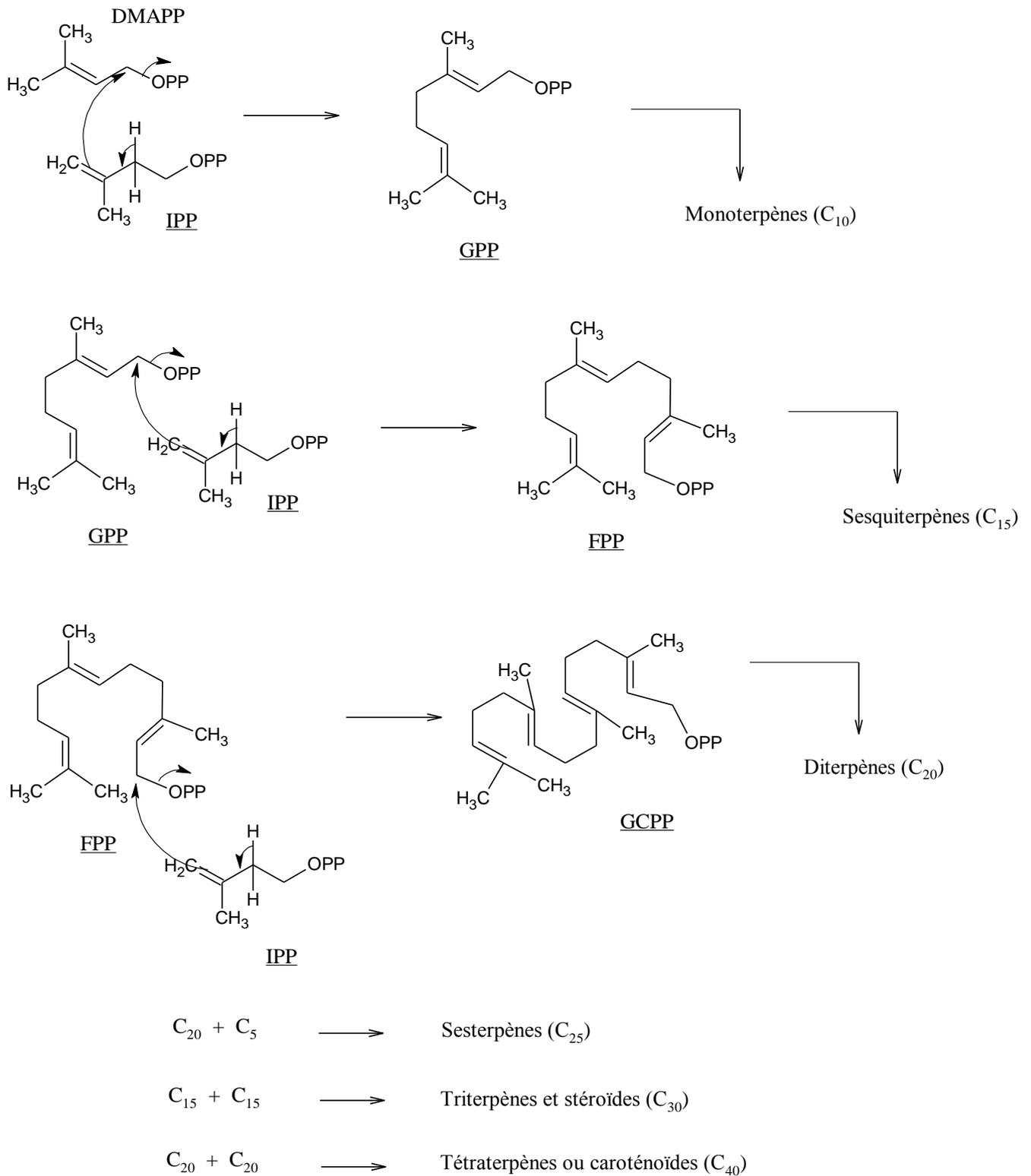


Figure 14 : Mécanisme du couplage de unités DMAPP et IPP pour former les monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes



II.6. Notion de chémotype :

Un Chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, de champignons ou de micro-organismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, biotope, etc.), bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas substantiellement transformées. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents, présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

Exemple du romarin [22] : Chémotype à cinéole, Chémotype à camphre et Chémotype à verbénone.

II.7. Facteurs influençant la composition :

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : L'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, les parasites, les virus et mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique. Ajouter à la complexité d'huiles volatiles, les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long du développement, aussi les chémotype ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques exemple, on compte pour *Thymus vulgaris* ; espèce morphologiquement homogène sept chémotype différents.

II.8. Utilisations et propriétés des huiles essentielles de la plante :

II.8.1. Utilisations

Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celles-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant ; il s'agit de l'industrie agroalimentaire et la parfumerie[23]. Les huiles essentielles interviennent dans la fabrication[23] :

- des produits alimentaires : jus de fruits, crèmes glacées, bonbons, etc.
- de tabac pour cigarettes ;



- des produits d'hygiène et de beauté ;
- des parfums, désinfection des locaux (antiseptiques) ;
- des colles et vernis dans l'industrie chimique.

II.8.2. Propriétés :

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires que les plantes généralement synthétisent en situation de stress ou pour combattre les agents infectieux ou parasitaires[24]. La commercialisation des huiles essentielles peut être orientée selon leur bio-activité.

Propriétés antimicrobiennes : Une grande variété des huiles essentielles sont connues pour posséder des propriétés antimicrobiennes, dans des nombreux cas, cette activité est due à la présence de constituants actifs, principalement attribuable aux isoprènes tels que les monoterpènes, les sesquiterpènes, et des phénols. Certaines huiles essentielles contenant des structures phénoliques, tels que le thymol et le carvacrol, sont très actifs contre un large spectre de micro-organismes [25] [26].

Propriétés antioxydantes : Avec la préoccupation croissante sur l'utilisation de ces agents de conservation et la demande croissante des consommateurs pour des produits naturels verts sans additifs, les industriels sont forcés à envisager l'incorporation de substances non chimiques dans leurs produits alimentaires ou cosmétiques. Les huiles essentielles sont considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles, qui ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes. Elles sont généralement utilisées comme arômes et additifs alimentaires.

Propriétés insecticides : Les premiers composés d'origine végétale ont été identifiés et isolés au 19^{ème} siècle, même si leur utilisation comme insecticide pourrait remonter au 17^{ème} siècle. Plusieurs travaux ont révélé que les huiles essentielles exposent des propriétés insecticides, nématocides, acaricides et larvicides.

Autres Activités : Les huiles essentielles et leurs monoterpènes affectent le métabolisme osseux lorsqu'elles sont ajoutées à la nourriture des rats. Il a été démontré que ces composés lipophiles inhibent la résorption osseuse [27].

II.9. Polyphénols :

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un



groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside, etc [3].

En effet, les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [3]. Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits[3].

II.10. Flavonoïdes : abrégé de biochimie végétale

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) représente une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [2]. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones) à quinze atomes de carbones.

Les flavonoïdes proviennent de l'addition de 3 groupements en C₂ à de l'acide p-hydroxycinnamique (ou acide coumarique) conduisant à deux noyaux benzéniques C₆, désignés par A et B, reliés par un hétérocycle en C₃. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme, généralement, un troisième cycle pyrone (figure 15).

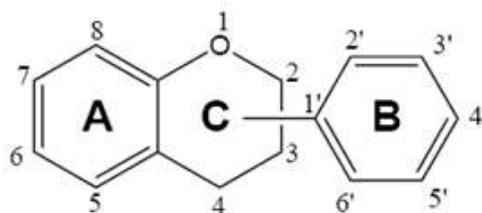
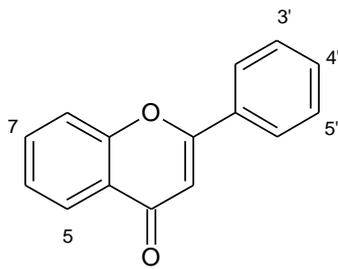


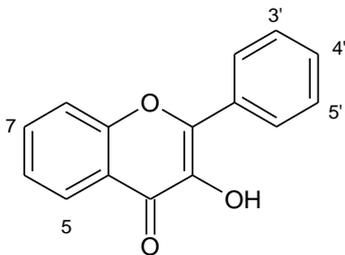
Figure 15 : Squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C, 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols et anthocyanidines.



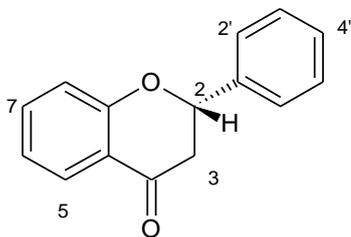
Flavones

Flavones	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
Chrysin	H	H	OH	H	H	H
Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H



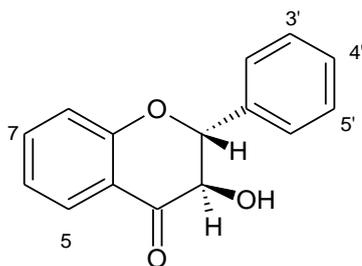
Flavonols

Flavonols	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Kamphérole	OH	H	OH	H	OH	H
Myricétine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Quercétine	OH	H	OH	OH	OH	H



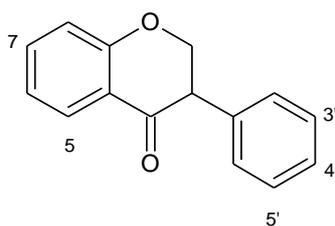
Flavanones

Flavanones	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH	H	OH	OH	OH	H
Hesperitine	OH	H	OH	OH	OMe	H
Naringénine	OH	H	OH	H	OH	H



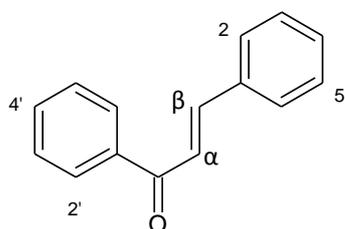
Dihydroflavonols

Dihydroflavonls	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Taxifoline	OH	H	OH	OH	OH	H
Fusetine	H	H	OH	OH	OH	H



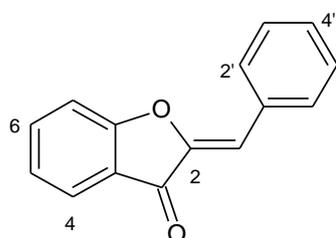
Isoflavones

Isoflavones	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Daidzeine	H	H	OH	H	OH	H
Génisteine	OH	H	OH	H	OH	H



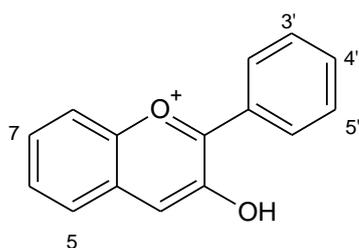
Chalcones

Chalcones	Substitution					
	2'	3'	4'	5'	6'	4
Davidigénine	OH	H	OH	H	H	OH
Asbogénine	OH	H	OH	H	OH	OH



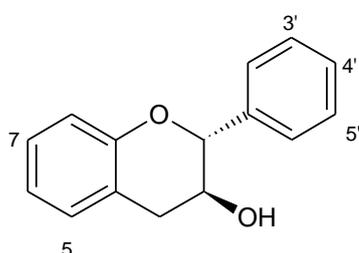
Aurones

Aurones	Substitution					
	4	6	7	3'	4'	5'
Leptosadine	H	OH	OMe	OH	OH	H
Maritimétine	H	OH	OH	OH	OH	H



Anthocyanes

Anthocyanes	Substitution					
	3	5	7	3'	4'	5'
Pelargonidine	OH	OH	OH	H	OH	H
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	H
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH



Flavanols

Flavanols	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Catéchine	OH	H	OH	OH	OH	H
Gallocatéchine	OH	H	OH	OH	OH	OH

II.11. Activité antioxydante :

Les flavonoïdes issues des huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels [3]. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène [3].

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fla-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fla-O) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable [3].

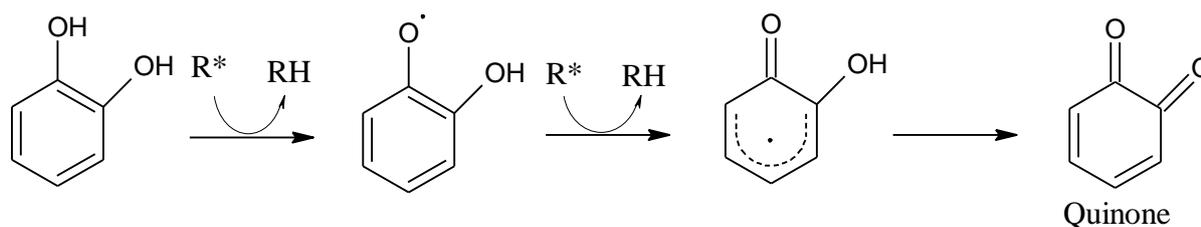


Figure 16 : Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes [3].

II.12. Activité antimicrobienne :

Les huiles essentielles permettent, entre autres, à la plante de se défendre contre les agressions extérieures. Elles ont des propriétés répulsives ou attractives vis-à-vis des insectes. La pollinisation des fleurs est, économiquement, très importante pour les arbres fruitiers. Elles présentent aussi des propriétés antiseptiques dirigées contre les parasites du sol et des propriétés inhibitrices sur la germination des graines sur le sol [20].

II.12.1. Généralités :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria [3].

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [3].

II.12.2. Culture des bactéries :

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C [3].



En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [3].

II.12.3. Description de la bactérie *Escherichia coli* utilisée :

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [3].

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [3].



Deuxième partie :

Matériels et Méthodes



I. Matière végétale :

Afin de simuler le comportement chez les consommateurs marocains, les graines de *Pimpinella anisum* sont achetées chez un herboriste.

II. Taux d'humidité :

Le taux de l'humidité représente la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Il a été déterminé en mettant un échantillon de matière végétal (3g) à sécher dans une étuve réglée à 80°C pendant 24h. Après refroidissement, une deuxième pesée a été effectuée.

L'humidité est exprimée en pourcentage et calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{mf - ms}{mf} \times 100$$

Avec : H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.
mf : masse de l'échantillon avant séchage (matière fraîche).
ms : masse de l'échantillon après séchage (matière sèche).

III. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par la méthode d'hydrodistillation, à l'aide d'un distillateur de type Dean Starck. Cette méthode consiste à immerger le matériel végétal dans l'eau à raison de 100 g du matériel végétal dans un ballon de 500 ml à fond rond, rempli à moitié d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition pendant 1h 30. Sous l'effet de la chaleur, les cellules renfermant les substances odorantes s'éclatent libérant ainsi l'huile essentielle. Cette dernière est entraînée par la vapeur d'eau et se condense par la suite en traversant le réfrigérant et chutent dans la burette graduée. Dès le début de la distillation, l'eau et l'huile essentielle sont séparés du fait de leur non-miscibilité.



Figure 17: Dispositif expérimental de l'hydrodistillation avec l'appareil Dean Starck

A la fin de l'hydrodistillation, le volume de l'huile essentielle (couche en haut) est lu directement à l'aide de la burette graduée de Dean Starck et récupéré à l'aide d'une micropipette et conservé dans un microtube à 4°C.





Quand on démonte le support du montage, on récupère le liquide et le résidu de l'anis vert qui reste dans le ballon afin de les utiliser pour les différentes extractions (aqueuse, méthanolique, par acétone et acétate d'éthyle).

III.1. Calcul du rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre le volume d'huile essentielle obtenue après l'extraction (V) et la masse sèche (ms), il est donné par la formule suivante :

$$Rdt (\%) = \frac{V \times d}{ms} \times 100$$

Avec : Rdt (%) : rendement en HE.
V: volume d'HE recueilli (ml).
d : la densité de l'anis vert
ms : masse végétale sèche (en g).

III.2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle :

L'étude analytique des huiles essentielles de *Pimpinella anisum* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (type Trace GC Ultra-Palarisq) couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) au Centre Universitaire Régional d'Interfaces (CURI) de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA), Fès. L'analyse s'effectue par injection de 1 µl d'extrait. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium He. La programmation de la température de la colonne initiale d'injection est de 40 °C pendant 2 min, puis s'élève par palier de 5°C/min à 280 °C pendant 10 min. Les spectres de masse sont enregistrés par un détecteur de type SCAN 50-650 et d'une bibliothèque spectrale de type NIST. L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel. Les composés volatils sont identifiés grâce à leur spectre de masse et à leur indice de rétention IR relatif calculé à partir du temps de rétention des composés séparés et d'alcane linéaires.

IV. Extrait aqueux :

On a adopté une nouvelle méthode qui consiste à utiliser le filtrat récupéré lors de l'hydrodistillation autant qu'extrait aqueux. Le filtrat est séparé de la matière végétale par simple filtration, puis il est concentré avec l'évaporateur rotatif et conservé dans un microtube à 4°C. Le rendement de l'extrait aqueux est calculé comme suivant :





$$R = \frac{m(\text{extrait})}{m} \times 100$$

Avec : m (extrait) : la masse de l'extrait aqueux
m : la masse de l'anis vert

V. Extraction par solvants :

La méthode d'extraction des principes actifs que nous avons adopté est l'extraction continue solide liquide à l'aide d'un extracteur Soxhlet. 25 g du matériel végétal est mis dans le corps en verre de l'extracteur Soxhlet qui est placé sur un ballon de 500 ml remplis de 150 ml du solvant. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs du solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide (matière végétale) dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au sommet du tube-siphon, ce qui provoque le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon, s'enrichit donc progressivement en composés solubles. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant.

1. Pierres ponce
2. Ballon à fond rond
3. Retour de distillation (tube d'adduction)
4. Corps en verre
6. Haut du tube siphon
7. Sortie du tube siphon
8. Condensateur
- 9 – 10. Sortie et entrée de l'eau de refroidissement

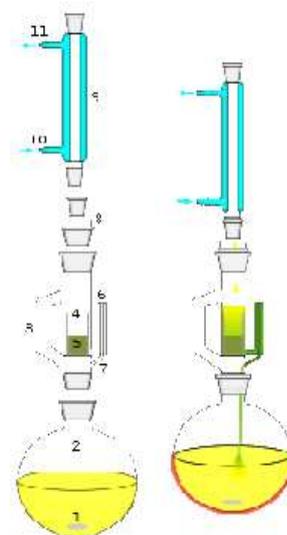


Figure 18 : Schéma explicatif de l'extracteur soxhlet

Notre approche dans ce travail vise l'utilisation de la masse végétale résiduelle de chaque extraction. Ainsi, la masse résiduelle de l'hydrodistillation servira de substrat pour les extractions ultérieures par Soxhlet et ainsi de suite. Le schéma suivant explique la procédure adoptée pour l'obtention des différents extraits en épuisant la même masse végétale.

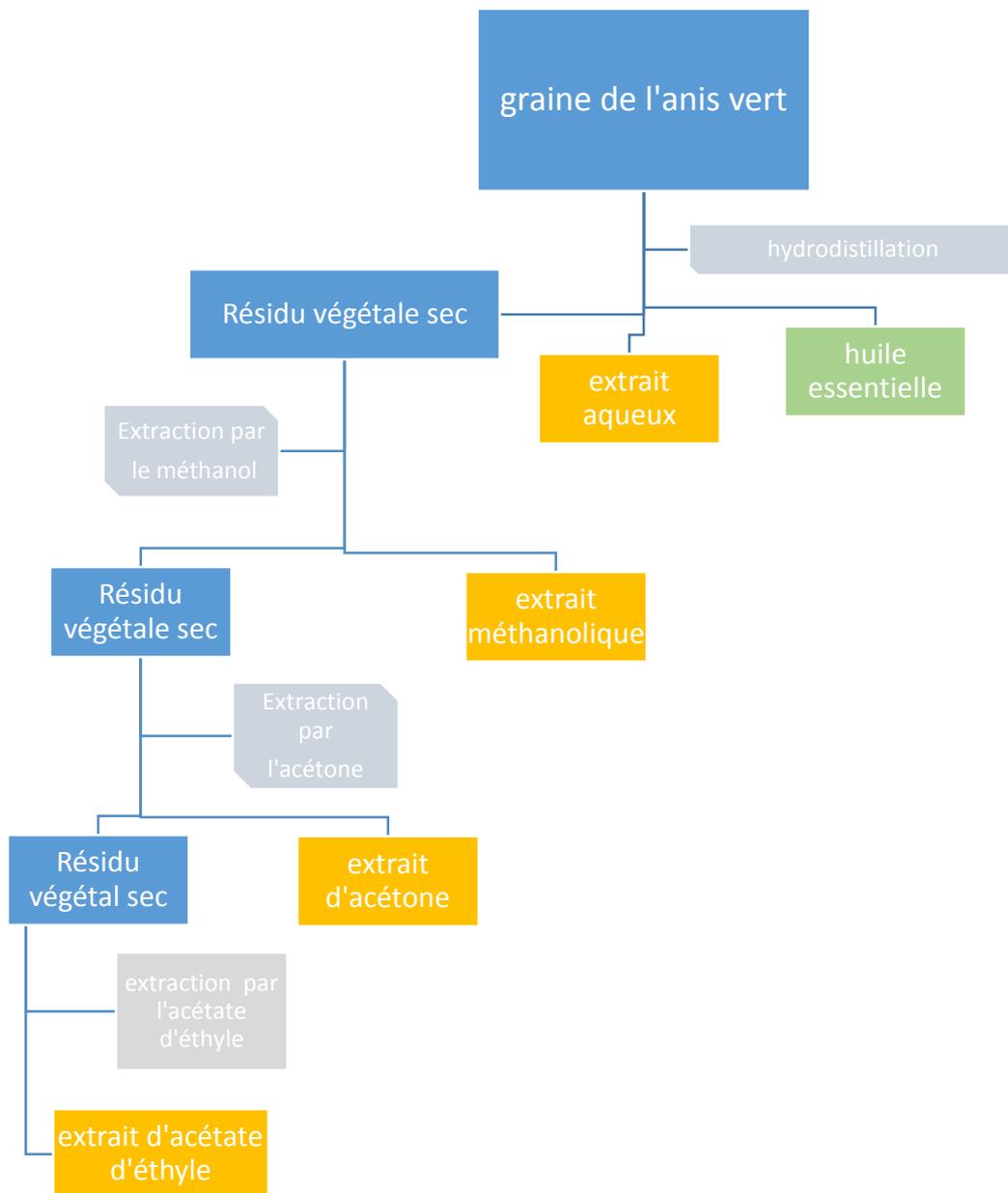


Figure 19 : Schéma général des extractions de l'anis vert par épuisement avec solvants

V.1. Extraction par épuisement du résidu de l'hydrodistillation :

Le résidu d'anis vert récupéré de l'hydrodistillation est mis dans un endroit aéré et à l'abri de soleil. Après séchage, il va subir plusieurs extractions successives par épuisement avec trois solvants de polarité différentes : le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle.



La première extraction est l'extraction méthanolique : on met dans le ballon 140 ml du méthanol et le matériel végétal est placé dans l'unité Soxhlet. On porte à l'ébullition pendant 3 heures à une température de 65°C. Ensuite on récupère le liquide du ballon, on le concentre par l'évaporateur rotatif à 40°C et on le conserve dans un microtube à 4°C. Le matériel végétal est ensuite séché et soumis à d'autres extractions dans les mêmes conditions mais avec d'autres solvants, il s'agit de l'acétone et l'acétate d'éthyle. Cette série d'extraction a permis d'obtenir trois extraits organiques bruts : extrait méthanolique (EM), extrait d'acétone (EAC) et extrait d'acétate d'éthyle (EAD), qui seront récupérés dans des microtubes puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.



Chacune des extractions citées est réalisée en triplet.

V.2. Extraction méthanolique de l'anis vert frais :

Afin d'évaluer l'effet de l'extraction sur la teneur en phénols et en flavonoïdes, nous avons réalisé une extraction directe sur les graines fraîches de l'anis en utilisant le méthanol comme solvant. Cette extraction a pour but la comparaison de l'extrait méthanolique issu des graines fraîches de l'anis avec celui issu des graines résiduelles de l'hydrodistillation en termes de teneur en phénols, en flavonoïdes et l'activité antiradicalaire. L'extraction est réalisée sur 25 g de l'anis frais par un appareillage Soxhlet et elle dure 3 heures ou jusqu'à ce que le solvant, dans l'extracteur, devient incolore. Le solvant est ensuite éliminé par un évaporateur rotatif sous pression réduite et à 40°C et l'extrait est mis dans un microtube et conservé à 4°C.



Figure 20 : Schéma explicatif de l'extraction méthanolique de l'anis vert frais



VI. Activité anti-oxydante (détermination du pouvoir anti-oxydant) :

VI.1. Principe :

Le pouvoir antiradicalaire ou l'effet « scavenger » sur le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une méthode qui est initialement utilisée pour déterminer les donneurs de protons dans les composés phénoliques [28].

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi l'apparition d'une coloration jaune pâle. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons[3].

La figure suivante montre le mécanisme de réduction du radical DPPH :

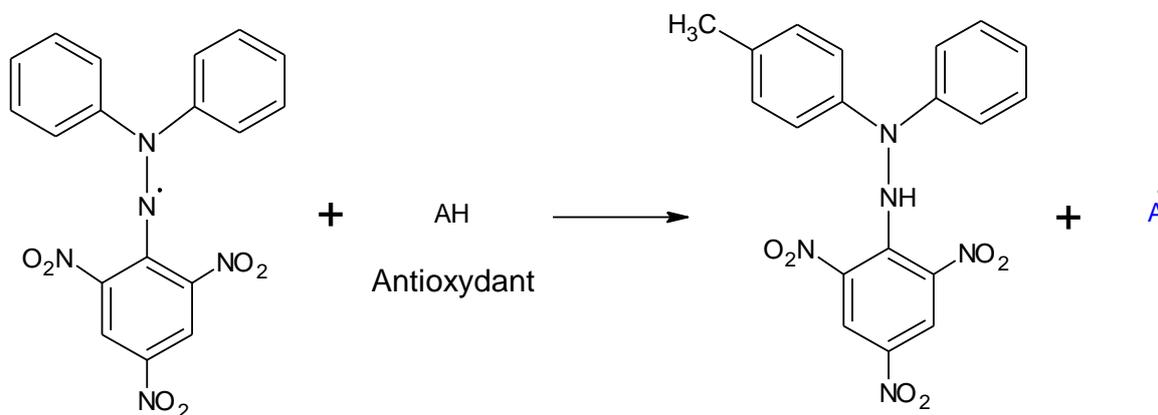


Figure 21 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant AH [28]

AH représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényl picryl hydrazine (jaune)[3] .



VI.2. Mode opératoire :

A partir de la solution mère, différentes concentrations des échantillons à tester sont préparées dans le DMSO comme le montre la figure suivante :

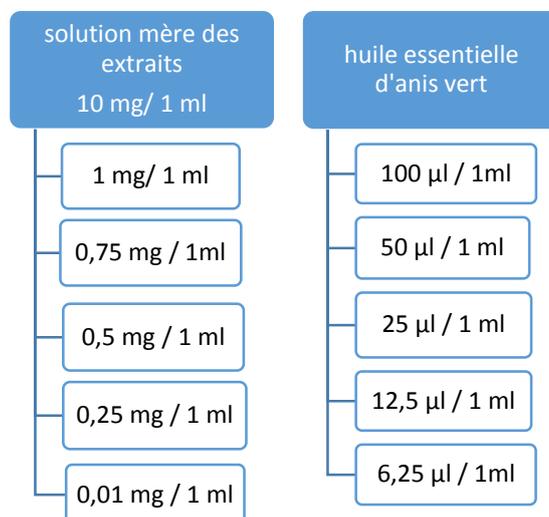


Figure 22 : Dilution des différents extraits de l'anis vert dans DMSO

Les extraits testés sont : l'extrait aqueux (EA), l'extrait méthanolique (EM), l'extrait de l'acétone (EAC), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAD), l'extrait méthanolique de l'anis vert frais (EMF), et l'huile essentielle de l'anis vert (HE).

0,1 ml de chaque concentration des extraits est ajouté à 2 ml de 0,041 mM de 2-2-diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH) dilué dans DMSO, le mélange est bien agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes [29].

L'absorbance des échantillons est mesurée à une longueur d'onde de 517 nm avec un spectrophotomètre (figure 24).



Figure 23 : Spectrophotomètre utilisé

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :



$$A.A.\% = \frac{\text{Abs (contrôle)} - \text{abs (échantillon)}}{\text{Abs (contrôle)}} \times 100$$

Avec :

A.A.% : l'Activité antiradicalaire %

Abs (contrôle) : l'absorbance contrôle

Abs (échantillon) : l'absorbance de l'échantillon

Les résultats sont la moyenne de deux mesures séparées \pm écart type.

L'IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'échantillon qui correspond à l'inhibition de 50 % du DPPH dans la solution. Par conséquent, plus la valeur de l'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante de l'échantillon testé est élevée. Ce paramètre est adopté pour comparer les activités des différents extraits[30].

VII. Dosage des polyphénols :

VII.1. Principe :

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Cioclateu : ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique H₃PW₁₂O₄₀ et d'acide phosphomolybdique H₃PMo₁₂O₄₀. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₂₃. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [3].

VII.2. Mode opératoire :

Dans un tube à essai, on ajoute 1ml de chaque extrait (dilué 10 fois) est mélangé avec 0,5 ml d'une solution de Folin-Cioclateu. Après 5 minutes, 5ml de la solution de Na₂CO₃ 5% est ajoutées sous agitation vigoureuse. Après 30 minutes de repos à température ambiante, on mesure l'absorbance à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm. La teneur en composés phénolique est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique (Gal) par gramme de l'échantillon [31].

VII.3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

Préparation de la gamme d'étalonnage :

On pèse 10 mg de l'acide gallique qui sera dilué dans 1 ml du DMSO (solution mère).



A partir de cette solution d'acide gallique de 10mg / 1ml, on prépare les dilutions suivantes :

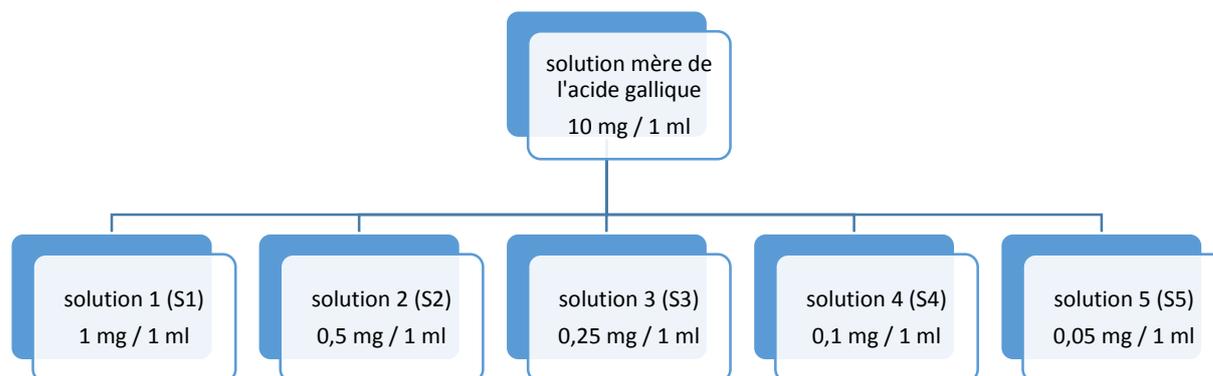


Figure 24 : Préparation des dilutions de l'acide gallique pour la réalisation de la courbe standard des polyphénols totaux.



Figure 25 : Dilutions de l'acide gallique

On prépare 5 tubes à essai avec :

- 1 ml de chaque solution diluée de l'acide gallique.
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu
- Ajouter 1 ml de la solution de Na_2CO_3 5% diluée dans l'eau distillée.

Les mélanges sont secoués et sont maintenues dans l'obscurité à température ambiante jusqu'à la lecture des absorbances par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm. Le blanc est représenté par 1 ml du DMSO additionné à 0,5 ml de Folin-Ciocalteu et 1ml de la solution de Na_2CO_3 5% diluée dans l'eau distillée. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage[28].

VIII. Dosage des flavonoïdes :

Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols.



VIII.1. Mode opératoire :

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode de trichlorure d'aluminium. 0,3 ml de 5% NaNO_2 a été mélangé avec une fraction aliquote (1 ml) de la solution d'extrait et après 5 minutes 0,3 ml de 10% d' AlCl_3 est ajouté. Une fois 6 minutes sont écoulées, 2 ml de NaOH 1M a été ajouté et le volume total a été constitué à 10 ml avec de l'eau distillée[32].

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par un standard étalon « la quercétine » à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg Qer / g d'extrait)[2].

VIII.2. Courbe d'étalonnage de la quercétine :

Préparation de la gamme d'étalonnage :

On prépare une solution mère de quercétine dans le DMSO (10 mg/ml). A partir de cette solution de la quercétine de 10mg / 1ml, on prépare les dilutions suivantes :

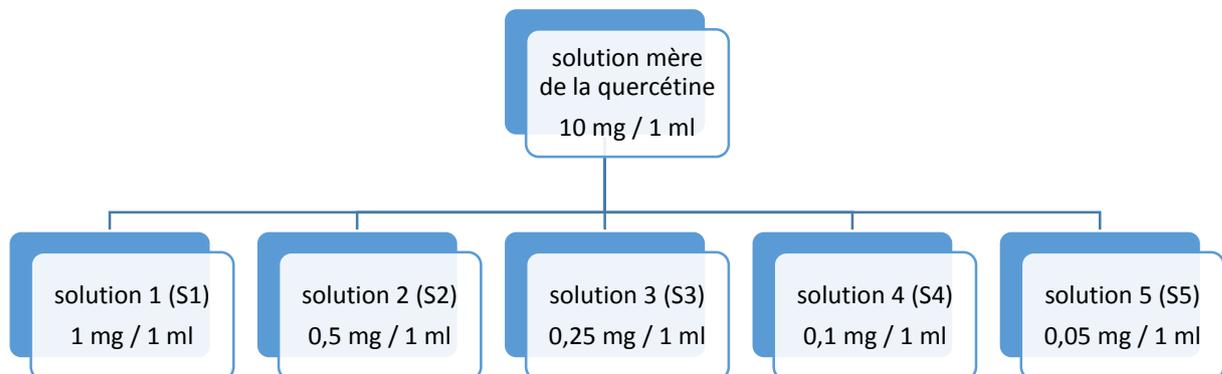


Figure 26 : Préparation des dilutions de la quercétine pour la réalisation de la courbe standard des flavonoïdes.



Figure 27 : Dilutions de la quercétine



IX. Dosage des lipides :

La matière végétale (20g) subit un broyage dans un mélange de solvant (chloroforme/méthanol/eau: 2/2/1,8) afin d'en extraire les lipides. Après broyage on effectue une filtration, ensuite on procède à une mise à l'étuve afin d'éliminer les dernières traces du solvant. Le résidu final est pesé après disparition complète du solvant[33].

Les lipides contenu dans les extraits sont calculés avec la formule suivante [33]:

$$\%LT = \frac{m_{lip}}{m_{tot}} * 100$$

- %LT : pourcentage de lipides totaux de la fraction (%LT)
- m_{lip} : masse totale des lipides dans la fraction en g.
- m_{tot} : masse de la fraction analysée en grammes.

X. Dosage des protéines :

Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Folin-Lowry [Lowry et al. (1951)].

X.1. Principe :

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al. (1951). Le sulfate de cuivre en milieu alcalin et le réactif de Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique) en présence d'une protéine donne une coloration bleue, qui est le résultat de deux réactions :

Réaction de Biuret : qui en présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine et le tryptophane, qui sont réduits en un complexe bleu.

Réactifs

- Solution A : Carbonate de sodium anhydre Na_2CO_3 (2%) en hydroxyde de sodium.
- Solution B : Solution de sulfate de cuivre CuSO_4 (0.5%).
- Solution C : Solution de tartrate de potassium de sodium (1%).
- Solution D : 48 ml A + 1ml B + 1 ml C mélangés immédiatement avant l'utilisation.
- Solution E : Folin-Ciocalteu-Ciocalteu : dilué 1:1 avec de l'eau pour donner une Solution à 1 N en acide.



X.2. Mode opératoire :

On ajoute à 5ml de la solution D 0.5ml de l'échantillon, le mélange est homogénéisé et laissé à température ambiante pendant 15min, on y ajoute 0.5ml du réactif de Folin et on laisse la réaction colorée se développe pendant 30 min à l'obscurité. La lecture de l'absorbance est effectuée à 700 nm [34].

N.B : La courbe d'étalonnage est établie avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) BSA : 0-1mg/ml.

XI. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Pimpinella anisum* sur E.Coli.

XI.1. Matériel biologique :

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Pimpinella anisum* été évalué sur la souche *Escherichia coli*. E. coli est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud.

XI.2. Culture bactérienne et préparation de l'inoculum

Afin de réaliser le test antibactérien, il faut préparer une préculture de la souche *E. coli*, ceci comme suivant :

XI.2.1. Repiquage des bactéries :

La souche E. Coli a été repiquée par la méthode des stries, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

Explication du repiquage par la méthode des stries : on dispose la solution microbienne avec l'anse dans le premier tiers de la boîte. On fait des stries avec des mouvements de va et vient au long de toute la boîte en prenant soin de ne pas traverser, arracher ou creuser le milieu.

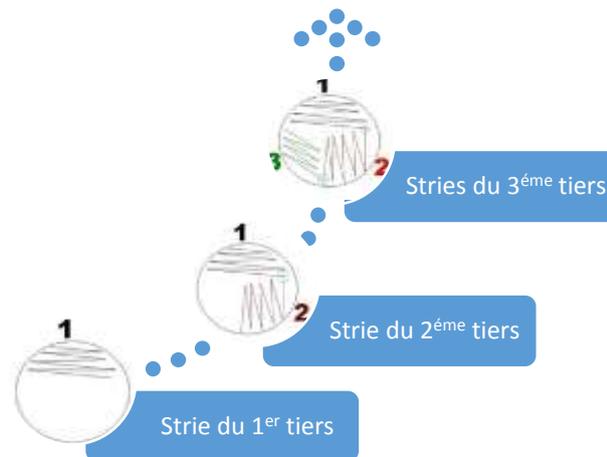


Figure 28 : Schéma explicatif du repiquage par la méthode des stries

N.B. : Il faut toujours faire des stries en prenant la solution microbienne de l'extrémité de la dernière strie avec une anse mise dans la flamme du bec jusqu'à incandescence.

Notre milieu est ainsiensemencé avec la solution bactérienne. On incube nos boîtes pendant 24 h à une température de 37 C⁰.

XI.2.2. Préparation de l'inoculum :

Des colonies bien séparées ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique puis portées à l'incubation pendant (24) heures à 37°C.

XI.3. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité a été réalisée en mélangeant l'huile essentielle de l'anis avec le milieu « *Luria-Bertani* » LB qui constitue un milieu pour la culture d'*Escherichia coli* [35]. Des volumes en huile essentielle allant de 10 jusqu'à 100µl ont été mélangés avec le milieu LB avec une agitation vigoureuse pour assurer une dispersion homogène de l'huile essentielle. Des milieux témoins exemptes d'huiles essentielles ont été préparés. Ces boîtes sontensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des microorganismes. Après 24h incubation, les boîtes sont sorties de l'étuve pour la lecture des résultats.



Troisième partie :

Résultats et Discussion



I. Humidité :

Le taux d'humidité de l'anis vert est calculé avec la formule suivante :

$$TH\% = \frac{mf - ms}{mf} \times 100$$

Le taux d'humidité est calculé dans 3 reprises avec des rendements de : 8,86 ; 9 et 9,12%.

Le taux d'humidité des graines de l'anis vert est de $8,99 \pm 0,09$ %.

II. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles de l'anis vert (*Pimpinella anisum* L.) est obtenue à l'aide de l'appareil Dean Stark. L'hydrodistillation de 100 g des graines de l'anis vert (*Pimpinella anisum*) a permis d'obtenir les volumes suivants de l'huile essentielle : 1,2 ; 1,5 et 1,1 ml. Le rendement moyen est de $1,26 \pm 0,15$ %.



Figure 29 : Image de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum*

L'huile essentielle obtenue présente les propriétés organoleptiques suivantes :

Aspect	: liquide mobile à température ambiante
Couleur	: transparente à jaune pâle
Odeur	: anisé
Goût	: sucré

II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* :

L'analyse de chromatographie du gaz couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) de l'huile essentielle de l'anis vert nous a permis d'identifier cinq composés majoritaires illustrés sur le chromatogramme :

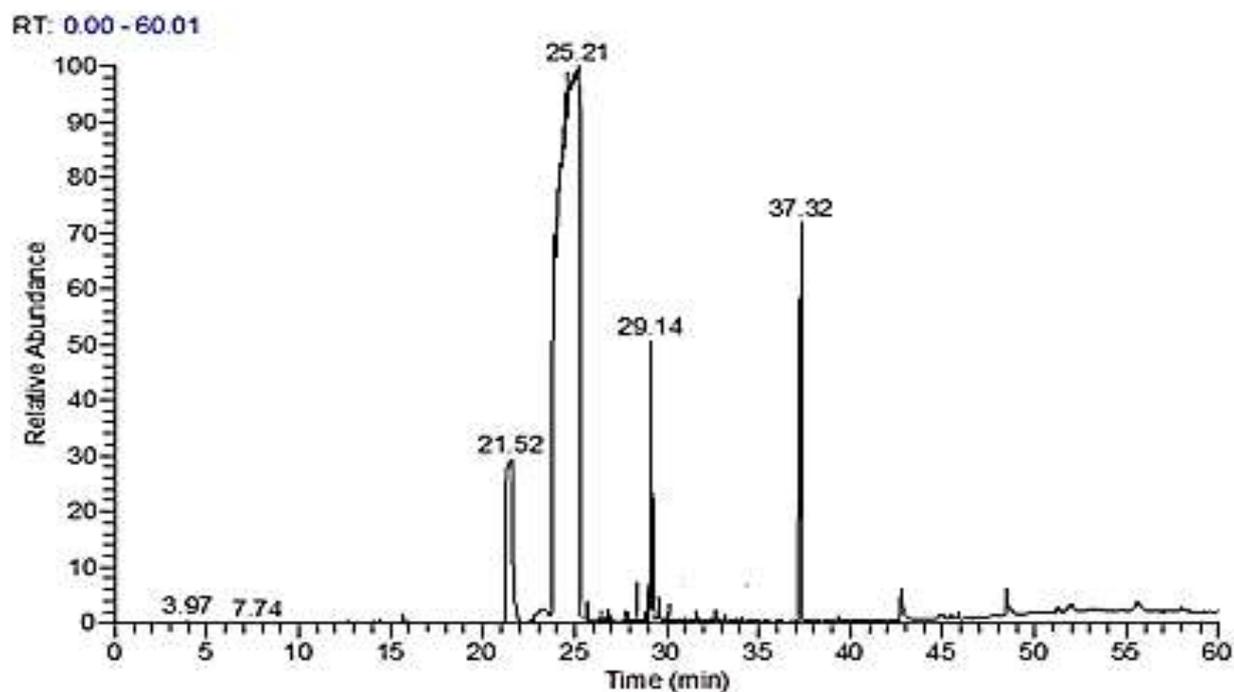


Figure 30 : Chromatographe obtenu par analyse CG/MS de l'huile essentielle de *pimpinella anisum*

Les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles, obtenues par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse (CG-SM), sont représentés dans le tableau 2 :

Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle de *pimpinella anisum*

Molécule	Apex RT	Début RT	Fin RT	Pourcentage %	Formule
Linalool	21,52	21,16	22,06	8,31	C ₁₀ H ₁₈ O
Trans-anéthole	25,21	23,71	25,35	82,93	C ₁₀ H ₁₂ O
Himachalène	29,14	28,74	29,7	3,56	C ₁₅ H ₂₄
Aromadendrène	37,32	37,11	37,39	4,68	C ₁₅ H ₂₄



Tableau 3 : Pourcentage des différents classe de l'huile essentielle

Classe	pourcentage
Monoterpènes	8,31
Phénylpropanoïdes	82,93
Sesquiterpène	8,24
Total	99,48

La composition chimique de *Pimpinella anisum* présenté se caractérise par un contenu élevé du trans-anéthole avec un pourcentage de 82,93%. Aussi, nous notons la présence du Linalool (8,31%), Aromadendrène (4,68%) et Himachalène (3,56%).

Le trans-anéthole appartient à la classe des phénylpropanoïdes la plus abondante dans l'huile essentielle de l'anis vert suivis par celle des monoterpènes qui contient linalool, à la fin, on trouve la classe des sesquiterènes qui contient himachalène.

Dans le tabelau suivant, on présente les résultats de la composition de l'huile essentielle de l'anis vert de différentes régions dans le monde :

	Linalool (%)	Trans-anéthole (%)	Himachalène (%)	Total (%)
Iran [36]	-	87,58	1,77	89,35
Turquie [37]	-	82,8	0,2	83
Turquie[6]	-	94,2	1,4	95,6
Athènes [38]	-	94,4	1,3	95,7
Algérie [39]	0,3	92,4	1,1	93,5
Serbie [15]	-	96,8	1,84	98,64

Tableau 4 : La composition de l'huile essentielle de l'anis vert de différentes régions du monde



III. L'extrait aqueux :

Le filtrat récupéré lors l'hydrodistillation est pris comme extrait aqueux. Dans 100g de l'anis vert on a eu un extrait aqueux avec un rendement moyen de $4,17 \pm 0,07$ %.

Tableau 5 : Résultats de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum*

L'extrait aqueux	L'Aspect	Le rendement (%)	Le rendement moyen (%)
	miellé	4,28	$4,17 \pm 0,07$
		4,14	
		4,10	

IV. Extraction par solvants organiques :

IV.1. Extraction méthanolique :

On a fait une extraction avec l'appareil Soxhlet de 25 g de l'anis vert frais en utilisant 150 ml du méthanol comme solvant pendant 3h.

Les résultats de l'extraction des trois reprises sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Résultats de l'extrait méthanolique à partir de *Pimpinella anisum* fraîche

L'extrait méthanolique frais	L'Aspect	Le rendement (%)	Le rendement moyen (%)
	Pâteux	12,5	$11,76 \pm 0,56$
		11,87	
		10,92	



IV.2. Extraction par épuisement :

25 g du résidu obtenu de l'hydrodistillation ont été traitées par appareil Soxhlet avec différents solvants de polarité décroissante : le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle.

Le tableau 4 montre les résultats de l'extraction en utilisant les différents solvants :

Tableau 7 : Résultats de l'extraction par épuisement de *Pimpinella anisum* par les solvants organiques

	Le pourcentage de l'extrait (%)	Le pourcentage moyenne de l'extrait (%)	Image
Extrait méthanolique (E.M.)	7,95	8,23 ± 0,28	
	8,65		
	8,09		
Extrait de l'acétone (E.A.C.)	0,51	0,60 ± 0,06	
	0,68		
	0,61		
Extrait de l'acétate d'éthyle (E.A.D.)	0,82	0,64 ± 0,12	
	0,60		
	0,5		

D'après les résultats illustrés sur le tableau, on constate que le méthanol est le solvant qui a pu extraire plus de matière végétale des graines d'anis (8,23 ± 0,28%), suivis par l'acétate



d'éthyle avec un rendement de $(0,64 \pm 0,12\%)$, et le solvant d'acétone avec un rendement de $(0,6 \pm 0,12\%)$. Ceci peut être attribué au fait que la grande majorité des composés de cette plante sont solubles dans le méthanol.

Remarque : L'extraction des graines de l'anis vert frais par le méthanol nous donne un rendement supérieur que les autres extractions par épuisement du résidu de l'hydrodistillation. Mais la quantité de matière extraite par la méthode d'épuisement de la graine de *Pimpinella anisum* est supérieure à celle extraite par le méthanol seul sur la graine fraîche $(11,76 \pm 0,56 \%)$.

V. Activité antiradicalaire :

V.1. L'activité antiradicalaire des différents extraits de *Pimpinella anisum* :

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de l'anis vert sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de l'anis vert

Concentration mg/ml	0.01	0.25	0.5	0.75	1
Extrait aqueux (%)	$13,69 \pm 0,03$	$17,04 \pm 0,09$	$18,63 \pm 0,15$	$24,44 \pm 0,06$	$40,47 \pm 0,31$
Extrait méthanolique (%)	$17,20 \pm 0,24$	$26,73 \pm 0,04$	$46,50 \pm 0,3$	$52,18 \pm 0,3$	$69,06 \pm 0,35$
Extrait d'acétone (%)	$24,39 \pm 0,15$	$27,20 \pm 0,14$	$31,37 \pm 0,81$	$43,95 \pm 0,9$	$49,81 \pm 0,52$
Extrait d'acétate d'éthyle (%)	$6,16 \pm 0,3$	$16,48 \pm 0,54$	$21,44 \pm 0,47$	$24,02 \pm 0,33$	$24,10 \pm 0,59$
Extrait méthanolique frais (%)	$11,60 \pm 0,75$	$21,18 \pm 0,36$	$25,42 \pm 0,59$	$66,22 \pm 0,34$	$72,53 \pm 0,87$

Les résultats figurant dans le tableau en-dessus, illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire des extraits de l'anis vert vis-à-vis du radical libre DPPH. La valeur de l'activité antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. Cela permet de mettre en évidence une diminution significative de la concentration du radical DPPH en raison de la capacité de piégeage des extraits de la graine de *Pimpinella anisum* les radicaux libres.



L'effet scavenging des différents extraits sur le DPPH décroît à la concentration de 1 mg / ml dans l'ordre décroissant suivant : extrait méthanolique frais > extrait méthanolique par épuisement > extrait d'acétone > extrait aqueux > extrait acétate d'éthyle

Les résultats du tableau sont illustrés sur le graphique suivant :

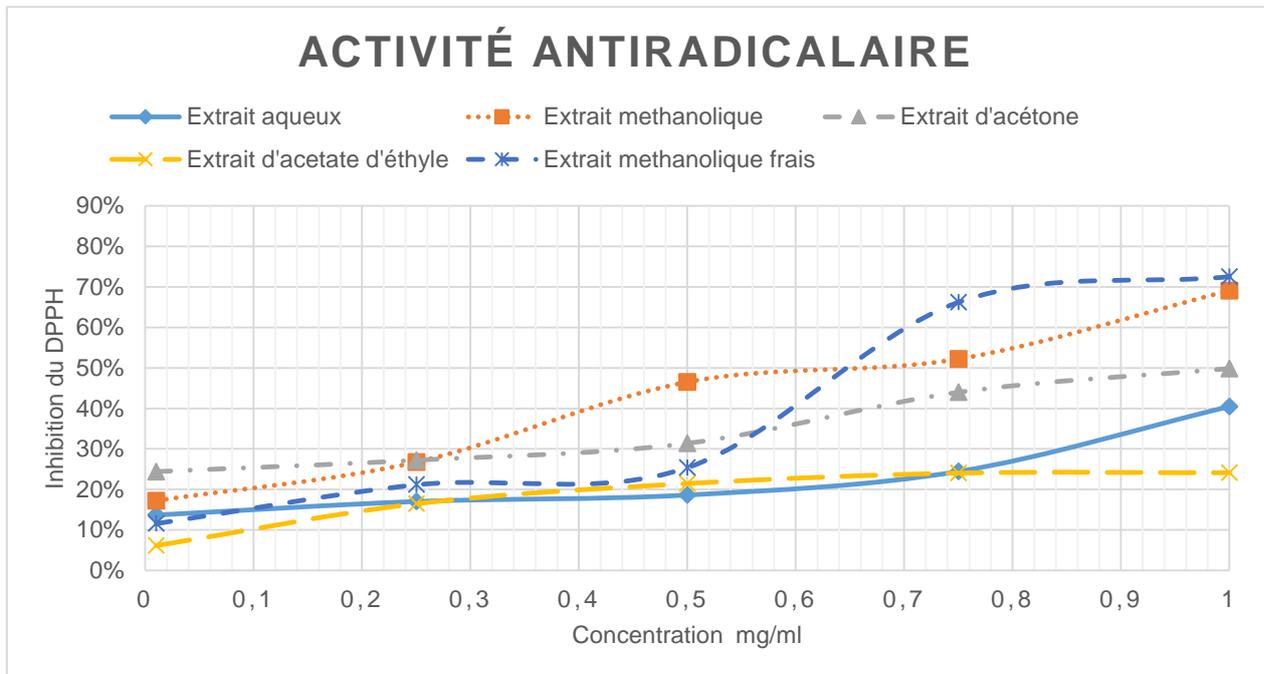


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par les différents extraits de l'anis vert en fonction de la concentration

D'après le graphique, on remarque que ; seuls les extraits méthanoliques qui ont pu réduire le DPPH à plus de 50% ; valeur connue sous le nom de IC_{50} . L'extrait méthanolique de l'anis vert frais atteint la valeur IC_{50} le premier avec une concentration de 0,648 mg/ml suivis par l'extrait méthanolique issu du résidu de l'hydrodistillation avec une concentration de 0,658 mg/ml. Les deux valeurs sont proches et ils ont une différence de 0,01 mg/ml.

Les valeurs de la concentration des extraits méthanoliques avec lesquelles on a pu atteindre la valeur IC_{50} sont proches cela signifie que nos extraits sont tous les deux riches en composés phénoliques et en flavonoïdes (les bons donneurs du proton H), et même on peut constater que la teneur des deux extraits en polyphénols est presque égales. D'autant plus, malgré le fait qu'il y a eu des pertes en certains composés phénoliques hydrosolubles durant l'extraction de l'huile essentielle, l'extrait méthanolique résultant des graines résiduelles de l'hydrodistillation présente quasiment la même efficacité que celui obtenu des graines fraîches.



Tous ces résultats indiquent clairement que les extraits méthanoliques de l'anis vert de vrais pièges à radicaux libres et des antioxydants puissants. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ces propriétés sont citées dans de nombreuses publications et rapport scientifiques, parmi eux, on cite le travail de l'article d'ALBAYRAK et ses collaborateurs (2011), qui compare l'activité antiradicalaire de l'anis vert (78.98%) avec celle du BHT (92.15%) à la concentration de 2 mg/ml. Ses résultats confirment que l'anis vert est un bon antioxydant[40].

V.2. Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* :

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* est illustrée dans le Tableau 6 et le graphique de la figure 12 :

Tableau 9: Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum*

Concentration de l'HE en $\mu\text{l/ml}$	6,25	12,5	25	50	100
Concentration de l'HE en mg/ml	5	11	21	43	85
Activité antiradicalaire de l'H.E. (%)	$11,17 \pm 0,25$	$31,24 \pm 0,89$	$58,68 \pm 0,57$	$76,09 \pm 1,02$	$84,50 \pm 0,95$

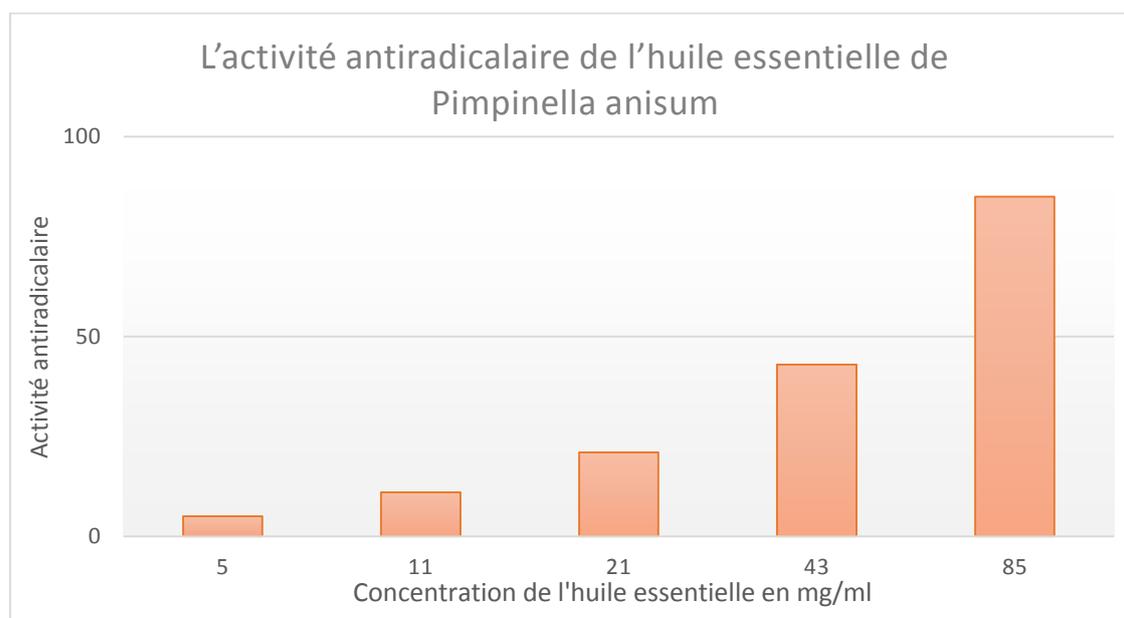


Figure 32 : Graphique qui représente l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* en fonction de la concentration



L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* augmente proportionnellement avec la concentration de l'huile essentielle dans DMSO.

V.3. Comparaison de l'activité antiradicalaire :

On va faire une comparaison de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais, de l'extrait méthanolique de l'anis vert récupéré après hydrodistillation et de l'huile essentielle de l'anis vert, la figure 38 illustre la différence :

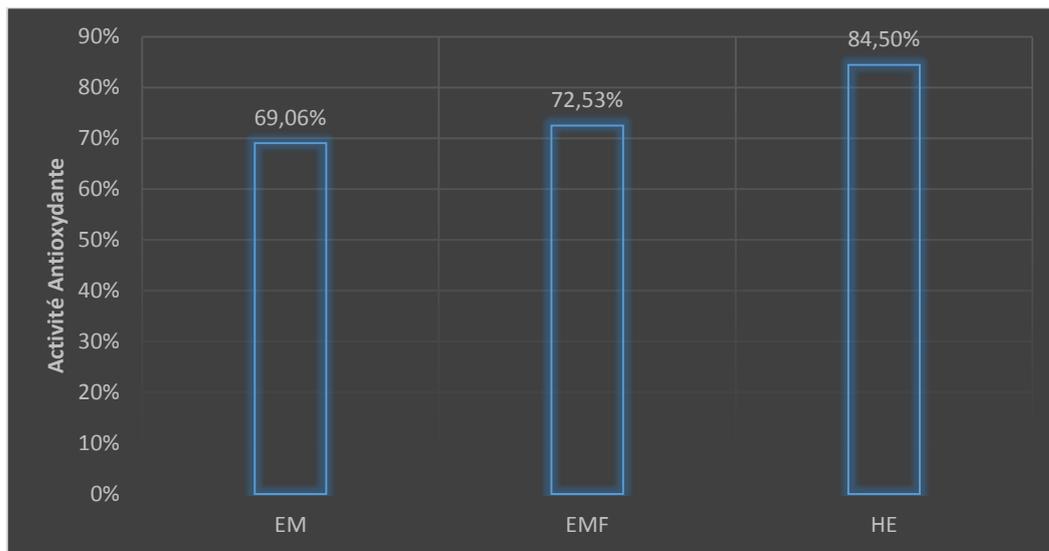


Figure 33 : Maximum d'inhibition de la DPPH par les extraits méthanolique et de l'huile essentielle

D'après le graphique ci-dessus, on constate que l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* montre une excellente activité antiradicalaire et elle est élevée par rapport aux deux extraits méthanoliques. L'huile essentielle a réussi à réduire ($84.50 \pm 0,95\%$) du DPPH, tandis que l'extrait méthanolique des graines fraîches n'a réduit que ($72.53 \pm 0,87\%$), alors que l'extrait méthanolique issu des graines résiduelles de la distillation n'a réduit que ($69.06 \pm 0,35\%$). Les figures ci-dessous illustrent par image l'efficacité de l'activité antiradicalaire des extraits méthanolique et de l'huile essentielle vis-à-vis le radical DPPH.



Figure 34 : Solution du DPPH

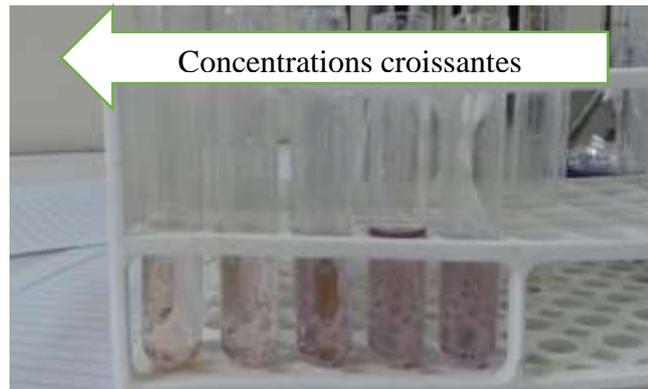


Figure 35 : Différentes dilutions des extraits des huiles essentielles

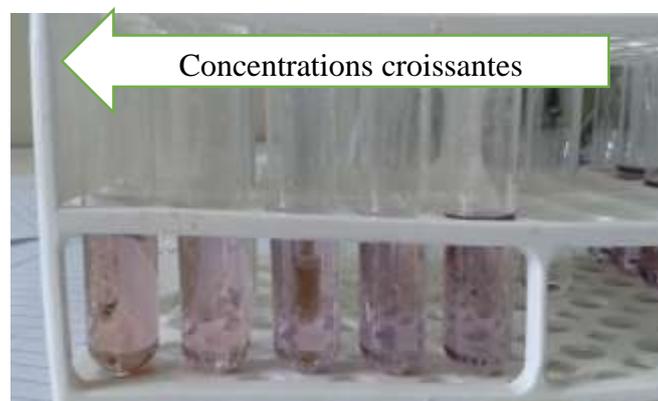


Figure 36 : Différentes dilutions des extraits par le méthanol

Quand la concentration en extrait méthanolique ou huile essentielle de l'anis vert augmente, on observe un changement de couleur violette, mais pour l'huile essentielle, on observe le jaune pâle dès la concentration 50 $\mu\text{l/ml}$, ce qui montre son activité antioxydante puissante.

VI. Dosage des polyphénols :

VI.1. Dosage des polyphénols des extraits par épuisement :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 750 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation :

$$y = 4,9314x \quad \text{avec } R^2 = 0,9277$$

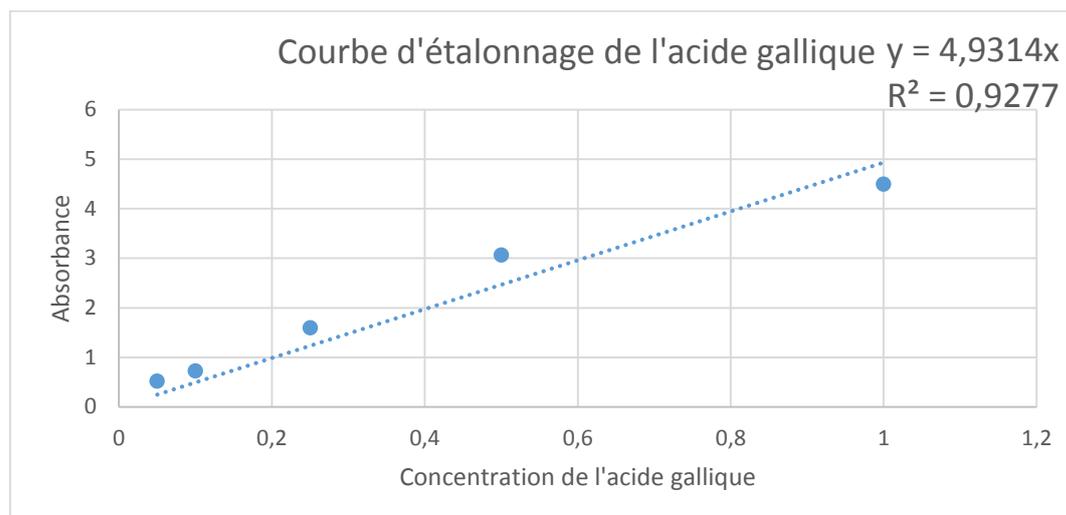


Figure 37 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme de poids de l'extrait (mg Gal / g extrait) et en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme d'anis (mg Gal / g d'anis). À partir de la courbe d'étalonnage, la teneur en polyphénols totaux des différents extraits est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Concentrations en polyphénols des extraits par épuisement de l'anis

Extrait	Teneur en polyphénols mg Gal/g extrait	Teneur en polyphénols mg Gal/g d'anis
Extrait aqueux	256,72	10,71
Extrait méthanolique	344,10	28,34
Extrait d'acétone	174,60	1,06
Extrait d'acétate d'éthyle	143,58	0,93
Total	919,00	41,04

D'après le tableau 9, on remarque que le méthanol est le solvant qui a pu extraire le maximum des polyphénols avec une valeur de 28,34 mg / g d'anis, suivi par l'eau (10,71 mg / g d'anis), l'acétone (1,06 mg / g d'anis) et l'acétate d'éthyle (0,93 mg / g d'anis). L'épuisement en composés phénoliques apparaît clairement dans les valeurs obtenues après dosage. La teneur en composés phénoliques des graines résiduelles de l'hydrodistillation a été comparée à celle



des graines fraîches. Alors nous avons soumis des graines d'anis fraîches à une extraction par le méthanol en utilisant l'appareillage Soxhlet. Le tableau 10 rapporte les résultats obtenus.

VI.2. Dosage des polyphénols de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais :

Tableau 11 : Teneur en composés phénolique des graines fraîches d'anis

Extrait	Teneur en polyphénols mg Gal/g extrait	Teneur en polyphénols mg Gal g d'anis
Extrait méthanolique frais	404,94	36,98

D'après ce tableau, on constate que la teneur des graines fraîches en composés phénoliques est de 36,98 mg/g d'anis. Nous remarquons que cette teneur est plus élevée que celle extraite du résidu de l'hydrodistillation. Cependant, l'avantage de l'extraction par épuisement est qu'en plus de la possibilité d'avoir des extraits riches en phénols, nous pouvons extraire les huiles essentielles aussi. Ceci sans apporter un changement significatif dans l'efficacité de l'activité antioxydante car en se basant sur les IC_{50} obtenus, l'extrait méthanolique des graines fraîche et celui des graines résiduelles ont la même efficacité en termes de réduction du radical libre DPPH. D'après ALBAYRAK et ses collaborateurs (2011) [40], on trouve que la concentration en polyphénols dans la graine de l'anis vert est de $32,93 \pm 0,6$ (mg Gal / g d'anis). Ce qui nous montre que l'anis vert sur lequel on a fait les analyses est plus riche en polyphénols. On confirme cela avec l'article de H.Womeni et ses collaborateurs (2013) [41] qui ont trouvé, par la méthode de Folin-Ciocalteu, une teneur en composés phénoliques dans la graine de l'anis vert de $29,6 \pm 0,17$ (mg Gal/g d'extrait).

Remarque :

La teneur en polyphénols extraite par la méthode d'épuisement (41,04 mg / g d'anis) est supérieure de celle extraite par le méthanol seul sur l'anis vert frais (36,98 mg/ g d'anis). Ceci est due au traitement thermique subit par les graines qui les a fragilisé permettant ainsi au solvant d'extraire encore plus de composé phénolique par rapport au cas des graines fraîches.

VII. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la quercétine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue à la longueur d'onde



de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation : $Y = 0,3877x$ $R^2 = 0,9577$

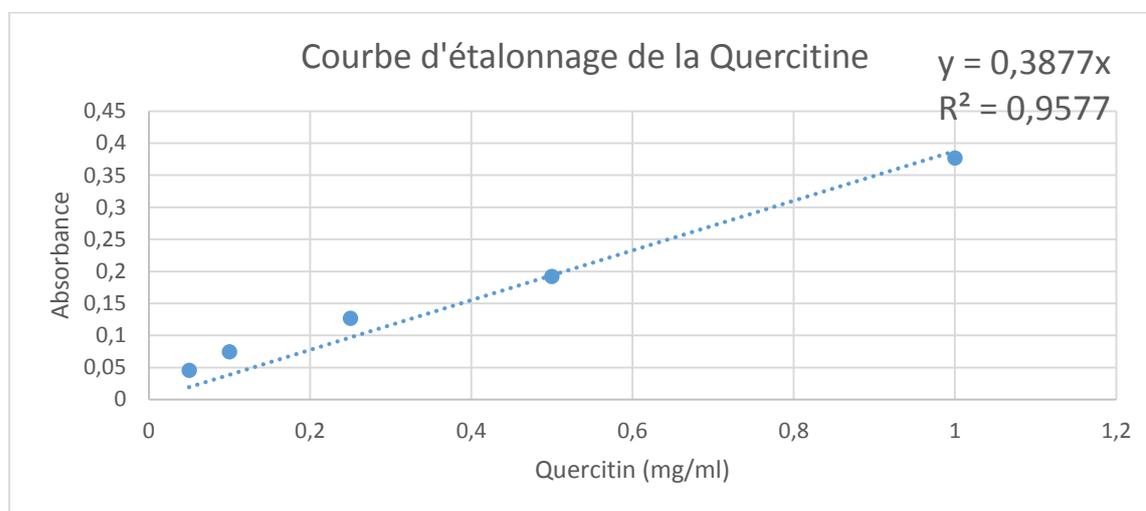


Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

VII.1. Dosage des flavonoïdes des extraits par épuisement :

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercitine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg Qer /mg extrait) et en milligramme d'équivalent de la quercitine par gramme de poids de l'anis vert (mg Qer / g d'anis).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes est :

Tableau 12 : Concentrations en flavonoïdes des extraits par épuisement de l'anis

Extrait	Teneur en flavonoïdes mg Qer / g extrait	Teneur en flavonoïdes mg Qer / g d'anis
Extrait aqueux	213,31	8,89
Extrait méthanolique	314,68	25,92
Extrait d'acétone	122,00	0,74
Extrait d'acétate d'éthyle	118,65	0,77
Total	768,64	36,31

Les résultats du dosage des flavonoïdes de la graine de *Pimpinella anisum* des extraits par des solvants de polarité décroissante est comme suivant : l'extrait méthanolique (25,92 mg/ g



d'anis) > l'extrait aqueux (8,89 mg/ g d'anis) > l'extrait d'acétate d'éthyle (0,77 mg/ g d'anis) > l'extrait d'acétone (0,74 mg/ g d'anis).

VII.2. Dosage des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de l'anis vert frais :

En épuisant les graines de l'anis par différents solvants, la teneur en flavonoïdes change avec le solvant utilisé et la valeur la plus grande est celle de l'extrait méthanolique (25,92 mg/g d'anis) puis l'extrait aqueux (8,89 mg/g d'anis), l'extrait d'acétate d'éthyle (0,77 mg/g d'anis) et l'extrait d'acétone (0,74 mg/g d'anis).

Tableau 13 : Concentrations en polyphénols de l'extrait méthanolique de l'anis frais

Extrait	Teneur en flavonoïdes mg Qer/g extrait	Teneur en flavonoïdes mg Qer/g d'anis
Extrait méthanolique frais	348,21	31,80

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de l'anis vert frais est de 31,80 mg/g d'anis, c'est une valeur supérieure par rapport à la concentration des flavonoïdes de l'anis issu de l'hydrodistillation, mais l'avantage de l'extraction par épuisement est qu'on peut extraire le maximum des flavonoïdes avec une concentration égale à 36,31 mg /g d'anis.

VIII. Dosage des protéines :

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry (1951). Le sérum albumine bovine est utilisé comme étalon. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 700 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation :

$$Y = 0,0015x \quad R^2 = 0,9305$$

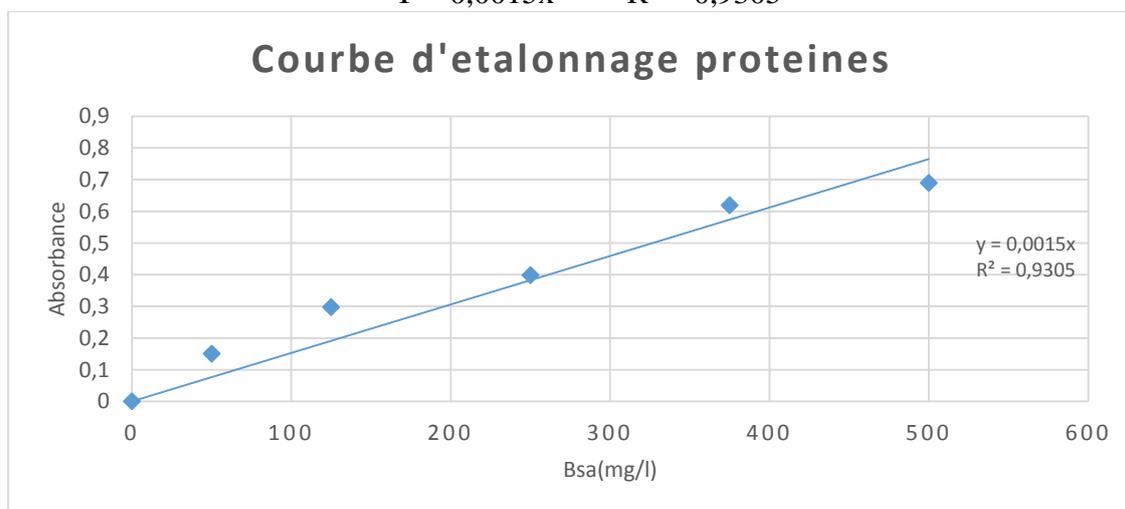


Figure 39 : Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovine



La teneur de la graine de *Pimpinella anisum* fraîche en protéines a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage : $17,22 \pm 0,28$ %, elle est proche à la valeur de la littérature avec une valeur de 18% de la masse en protéine[42].

IX. Dosage des lipides :

La teneur de la graine de *Pimpinella anisum* fraîche en lipides est de $5,62 \pm 0,24$ %. Ce résultat trouvé est inférieure à celui dans la littérature qui se situe entre 8 et 11 % en masse de lipides riches en acides gras tels que l'acide palmitique et oléique.

X. Activité antibactérienne :

Les essais d'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'anis est représenté dans le tableau suivant :

Souche testée : Escherichia Coli		
		
Blanc	0.01%	0.23%
		
0.35%	0.5%	1%

Tableau 14 : Essai d'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'anis sur *Escherichia Coli*

La croissance de la souche microbienne est représentée dans le tableau précédent.



Dans cette étude, nous avons fait appel à une souche bactérienne à gramme négatif (*E.coli*). L'huile essentielle a été ajoutée au milieu avec des proportions allant de 0,01% à 1% du volume total du milieu. Les résultats montrent qu'à partir de la concentration 0,35% aucune croissance bactérienne n'est perçue. Au niveau de ce test, cette concentration est inhibitrice. La vérification s'est faite par la prise d'un échantillon en raclant un écouvillon stérile sur la surface du milieu gélosé, ensuite on le plonge dans un tube eppendorf remplis d'eau physiologique. L'eau physiologique est ensuite déposée dans une boîte de petri contenant le milieu « LB » et aussi dans un tube contenant le milieu « LB » liquide, ensuite elle est incubée à 37°C durant 24h. A l'issue de cette manipulation aucune croissance bactérienne n'a été constaté confirmant ainsi, non seulement le statut de concentration inhibitrice, mais aussi le test avec le milieu liquide a confirmé celui de bactéricide en le comparant avec un échantillon de *E.Coli* issu de la boîte « blanc » qu'on a considéré comme échantillon de référence (l'absorbance est mesuré à 620 nm contre une solution contrôle ne contenant que le milieu « LB »). Nous avons choisi cette méthode pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'anis pour la quantité d'information qu'on peut en réduire ; la méthode offre une appréciation claire et visuelle sur l'efficacité de l'huile essentielle. Contrairement aux autres méthodes (méthode des disques, des puits), celle-ci permet de disperser l'huile essentielle dans un volume précis du milieu de culture ce qui lui permet de couvrir toute la surface du milieu de culture une fois solidifié après refroidissement. Ainsi une bonne dispersion de l'huile essentielle dans le milieu ne donnera pas lieu à des résultats contradictoires. Plusieurs travaux ont rapporté l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'anis sur *E.Coli*. Hammer et ses collaborateurs ont trouvé que la CMI de l'huile essentielle de l'anis sur la souche *E.Coli* a été de 0,5% du volume totale du milieu [43]. D'après J. Reichling et ses collaborateurs la concentration minimale d'inhibition est de 0.78–1.56% de l'huile essentielle de l'anis vert[44].

D'après les travaux de G. Singh et ses collaborateurs (2002) [45], ont confirmé que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* est efficace contre la bactérie *E.Coli*. Les résultats montrent aussi que l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* a une très bonne activité antibactérienne et peut être exploitée contre *S. aureus* (responsable d'infection de la peau), *S. haemolyticus* (provoquant une infection de la gorge et du nez) et *B. subtilis* (infection chez les patients immunodéprimés). Cette huile peut également être utilisée pour contrôler *P. aeruginosa* (causant les infections nosocomiales), *E. coli* (responsables d'infections des voies génito-urinaires et diarrhée), *SPS Klebsella* et *P. vulgaris*. L'huile de *C.*



capicum peut également être exploitée contre *C. diphtheriae* (causant la diphtérie de différents organes). Ces observations suggèrent que l'huile essentielle peut être envisagée autant qu'alternative aux agents antimicrobiens de synthèse. Elle peut être exploitée comme une source alternative d'agent antibactérien naturel.

Tableau 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* [45].

		Concentration de H.E. en DMSO (%)	Zone d'inhibition (mm)
Gram +	B. subtilis	100	34
		2	12
		1	08
		0,5	Négatif
Gram -	E. Coli	100	26
		2	14
		1	0,9
		0,5	Négatif



Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, on fait une étude sur *Pimpinella anisum* (l'anis vert) afin de la valoriser en étudiant ses propriétés phytochimique, ses activités antioxydantes et antimicrobiennes. Le dosage des protéines a révélé que les graines de l'anis vert étudiées en contiennent $17,22 \pm 0,28$ %. Tandis que la fraction lipidique de ces graines est de $5,62 \pm 0,24$ %.

La graine de l'anis vert a été soumise à des extractions successives en utilisant des solvants dont la polarité décroît au cours de l'extraction. Ceci a permis l'obtention de différents extraits avec différentes caractéristiques ; teneur en composés phénoliques et efficacité en termes d'activité antiradicalaire. L'extraction de l'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation, et l'analyse CPG/MS a révélé que le composé majoritaire de cette huile essentielle est le Trans-anéthole (82.93%).

L'activité antioxydante des différents extraits et de l'huile essentielle d'Anis vert a été évaluée par la méthode du radical libre DPPH. L'activité antiradicalaire est intéressante dans les deux extraits méthanoliques (issu du résidu par épuisement et celui de l'anis vert frais), par contre elle est faible pour les deux autres extraits (extrait d'acétone et d'acétate d'éthyle). L'activité antiradicalaire la plus idéale est observée chez l'huile essentielle de l'anis vert.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur la souche bactérienne E.Coli. Les résultats indiquent que l'huile essentielle de l'anis vert possède une activité antibactérienne intéressante sur la souche testée. Le test a révélé que l'huile essentielle avait un effet bactéricide à la dose 0.35%.

Les résultats montrent que les graines du *Pimpinella anisum* sont très nutritif en raison de leur teneur élevée en protéines. Aussi, l'huile essentielle de l'anis vert s'est avérée très intéressante par son activité antiradicalaire et aussi son activité antibactérienne. En plus de



l'huile essentielle, la soumission des graine de l'anis à des extractions successives nous a permis d'avoir depuis le même substrat d'autre extraits riches en composé phénolique dont l'activité antiradicalaire été très intéressante.

A la lumière de ces résultats, nous concluons que les graines de l'anis vert sont très riches en composé bioactifs et que l'application de ces extraits dans le domaine agroalimentaire peut s'avérer très intéressant afin de remplacer les produits de synthèse.



Perspectives

En perspectives, nous envisageons de mener une étude détaillée sur la composition exacte des différents extraits (obtenus par les solvants utilisés) et de procéder à la séparation des différents composés qui constituent les extraits étudiés par chromatographie.

Aussi nous envisageons de diversifier les techniques qui évaluent l'activité antioxydante de ces extraits de l'huile essentielle.

En ce qui concerne les huiles essentielles nous projetons de mener une étude axée sur l'optimisation du rendement en huile essentielle et aussi de faire le suivi de la variation de la composition de cette dernière selon les conditions et la méthode d'extraction adoptés.

Enfin nous projetons d'élargir le nombre de souche microbienne qui seront soumises au test de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et aussi des extraits.



Bibliographie

- [1] I. Kosalec, S. Pepeljnjak, and D. Kustrak, “Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae).,” *Acta Pharm.*, vol. 55, no. 4, pp. 377–385, 2005.
- [2] N. E. H. BOUKRI, “Contribution à l’étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout,” université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie 2014.
- [3] M. Boudjouref, “Etude de l’activité antioxydante et antimicrobienne d’extraits d’*Artemisia campestris* L.,” université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie 2011.
- [4] H. Ullah, A. Mahmood, M. Ijaz, B. Tadesse, and B. Honermeier, “Evaluation of anise (*Pimpinella anisum* L.) accessions with regard to morphological characteristics, fruit yield, oil contents and composition,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, no. 29, pp. 2177–2186, 2013.
- [5] F. a. Al-Bayati, “Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 116, no. 3, pp. 403–406, 2008.
- [6] N. Tabanca, B. Demirci, T. Ozek, N. Kirimer, K. H. C. Baser, E. Bedir, I. a. Khan, and D. E. Wedge, “Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1117, no. 2, pp. 194–205, 2006.
- [7] P. Filliat, “les plantes de la famille des apiacees dans les trouble digestifs,” thèse, Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de GRENOBLE, 2012.
- [8] N. Arslan, B. Gürbüz, E. O. Sarihan, A. Bayrak, and A. Gümüüşçü, “Variation in essential oil content and composition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations,” *Turkish J. Agric. For.*, vol. 28, no. 3, pp. 173–177, 2004.
- [9] M. Jordral, *Illicium, Pimpinella and Foeniculum*, CRA PRESS. Taylor and Francis e-Library, 2005.
- [10] M. R. BIN MD DEROS, “Production and characterization of extraction oil from natural spices : a comparison study with functional group content of *Zea May* and *Elaeis Guineensis* jacq. oil,” Universiti Malaysia Pahang, 2008.
- [11] N. Lemery and S. Morelot, *nouveau dictionnaire général des drogues simples et composées*. Paris : Rémond, libraire, Rue Pavée S.-André, 1807.



- [12] I. Gülçin, M. Oktay, E. Kireççi, and Ö. I. Küfrevioğlu, "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts," *Food Chem.*, vol. 83, no. 3, pp. 371–382, 2003.
- [13] H. Ullah, A. Mahmood, and B. Honermeier, "essential oil and composition of anise (*pimpinella anisum* l.) with varying seed rates and row spacing," *Pac. J. Bot*, vol. 46, no. 5, pp. 1859–1864, 2014.
- [14] N. Cengiz, "Hepatoprotective Effects of *Pimpinella anisum* Seed Extract in Rats," *pharmacologyonline*, pp. 870–874, 2008.
- [15] M. Acimovic, V. Tesevic, M. Todosijevic, J. Djisalov, and S. Oljaca, "Compositional characteristics of the essential oil of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* grown in Serbia," *Bot. SERBICA*, vol. 39, no. 1, pp. 9–14, 2015.
- [16] M. Janahmadi, S. Farajnia, J. Vatanparast, H. Abbasipour, and M. Kamalinejad, "The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* L. (*Umbelliferae*) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, pp. 360–365, 2008.
- [17] S. Kadan, M. Rayan, and A. Rayan, "Anticancer Activity of Anise (*Pimpinella anisum* L.) Seed Extract," *Open Nutraceuticals J.*, vol. 6, pp. 1–5, 2013.
- [18] Aurand and W. Leonard, *Food composition and analysis*, vol. 4. 1966.
- [19] D. Festy, *Les huiles essentielles à respirer_ La méthode la plus simple pour profiter des bienfaits de l'aromathérapie*, Quotidien . 2014.
- [20] J. Kaloustian and F. Hadji-Minaglo, *La connaissance des huiles essentielles _ qualitologie et aromathérapie*, Springer. paris, 2012.
- [21] A. GAUDA, "Etude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie," thèse doctorale, université Toulouse 3 Paul Sabatier Faculté des Sciences Pharmaceutiques, france 2013.
- [22] L. Duval, "Les huiles essentielles à l'officine," thèse du doctorat, Université de Rouen de medecine et de pharmacie de Rouen, 2012.
- [23] M. Y. Sayah, "activité larvicide des extraits de plantes aromatiques sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires," mémoire de master, Faculté Sciences et Techniques Fès, 2011.
- [24] J. P. Rauha, S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kähkönen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela, "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing



- flavonoids and other phenolic compounds,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 3–12, 2000.
- [25] L. El, C. Alaoui Jamali, K. Bekkouche, L. Hassani, H. Wohlmuth, D. Leach, and A. Abbad, “Chemical composition , antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species,” *Ind. Corps Prod.*, vol. 43, pp. 450–456, 2013.
- [26] M. Hosseini Behbahani, Y. Ghasemi, M. J. Khoshnoud, P. Faridi, G. Moradli, and N. Montazeri Najafabady, “Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species,” *Pharmacogn. J.*, vol. 5, no. 2, pp. 77–79, 2013.
- [27] R. C. Mühlbauer, a. Lozano, S. Palacio, a. Reinli, and R. Felix, “Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism,” *Bone*, vol. 32, no. 4, pp. 372–380, 2003.
- [28] F. LECHEB, “Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de la matière grasse du noyau des dattes : essai d’incorporation dans une crème cosmétique de soin,” Université M’hMED BOUGARA Boumerdès, algérie 2010.
- [29] I. Jang, E. Jo, M. Bae, H. Lee, G. Jeon, H. Yuk, G. Ahn, and S. Lee, “Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv . Fuyu) fruit,” vol. 4, no. 2, pp. 155–160, 2010.
- [30] Z. Ali Yousef, “Biochemical Evaluation of Some Natural Products against Toxicity Induced By Anti-tubercular drugs in Rats,” *New York Sci. J.*, vol. 5, no. 10, pp. 69–80, 2012.
- [31] W. Xi, Y. Zhang, Y. Sun, Y. Shen, X. Ye, and Z. Zhou, “Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 466–474. 2014.
- [32] K.Sarabjot & M.Poonam, “Study of Total Phenolic and Flavonoid Content , Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants,” *J. Microbiol. Exp.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [33] E. G. Bligh and W. J. Dyer, “A rapid method for total lipid extraction and purification.,” *Can.J.Biochem.Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [34] B. OLIVER, H. LOWRY, NIRA, J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, “protein measurement with the folin phenol reagent,” *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.



- [35] W. Feng and X. Zheng, "Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo," *Food Control*, vol. 18, no. 9, pp. 1126–1130, 2007.
- [36] A. Jamshidzadeh, A. Hamed, A. Altalqi, and A. Najibi, "Comparative Evaluation of Analgesic Activities of Aniseed Essential and Fixed Oils," *Int. J. Pharm. Res. Sch.*, vol. 3, no. 1, pp. 227–235, 2014.
- [37] B. Tepe, H. A. Akpulat, M. Sokmen, and D. Daferera, "Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey," *Food Chem.*, vol. 97, pp. 719–724, 2006.
- [38] A. C. Kimbaris, G. Koliopoulos, A. Michaelakis, and M. a. Konstantopoulou, "Bioactivity of *Dianthus caryophyllus*, *Lepidium sativum*, *Pimpinella anisum*, and *Illicium verum* essential oils and their major components against the West Nile vector *Culex pipiens*," *Parasitol. Res.*, vol. 111, no. 6, pp. 2403–2410, 2012.
- [39] S. Saibi, M. Belhadj, and E.-H. Benyoussef, "Essential Oil Composition of *Pimpinella anisum* from Algeria," *Anal. Chem. Lett.*, vol. 2, no. 6, pp. 401–404, 2012.
- [40] S. Albayrak, A. Aksoy, O. Sagdic, and S. Albayrak, "antioxydant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in turkey," *J. Food Biochem.*, pp. 1–8, 2011.
- [41] H. M. Womeni, F. T. Djikeng, B. Tiencheu, and M. Linder, "Antioxidant potential of methanolic extracts and powders of some Cameroonian spices during accelerated storage of soybean oil," *Adv. Biol. Chem.*, vol. 3, pp. 304–313, 2013.
- [42] A. Shojaii and M. Abdollahi Fard, "Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*," *ISRN Pharm.*, vol. 2012, pp. 1–8, 2012.
- [43] K. Hammer, C. F. Carson, and T. V. Riley, "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 86, no. 6, pp. 985–990, 1999.
- [44] J. Reichling, P. Schnitzler, U. Suschke, and R. Saller, "Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview," *Forsch. Komplementarmed.*, vol. 16, no. 2, pp. 79–90, 2009.
- [45] G. Singh, I. P. S. Kapoor, S. K. Pandey, U. K. Singh, R. K. Singh, and A. Gram, "Studies on Essential Oils: Part 10; Antibacterial Activity of Volatile Oils of Some Spices," *Phyther. Res.*, vol. 682, pp. 680–682, 2002.