

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA  
BADJI MOKHTAR – ANNABA UNIVERSITY



جامعة باجي مختار – عنابة

Faculté : Sciences de l'ingénierie  
Département : Génie des procédés  
Domaine : Sciences et Technologie  
Filière : Génie des procédés  
Spécialité : Génie des procédés de  
environnement

## Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Thème:

EXTRACTION D'HUILES FIXES ET ESSENTIELLES DE L'ESPECE VEGETAL  
PINPEINELLA ANISUM EN VUE D'UNE APPLICATION COMME AGENT ANTI-  
OXYDANT, ANTI-ENZYMATHIQUE ET ANTI-CHOLINESTERASE

Présenté par :

- HEMISSI RABAB
- TALHI HANIFA

Encadrant : ABDENABI ABIDI  
Annaba

MCA

BADJI Mokhtar -

### Jury de Soutenance :

<b>FERTIKH NADIA</b>	PR	BADJI Mokhtar - Annaba	Président
<b>ABIDI ABDENABI</b>	MCA	BADJI Mokhtar - Annaba	Encadrant
<b>LARBI LYNDA</b>	MCA	BADJI Mokhtar - Annaba	Examineur

Année Universitaire : 2020/2021

# REMERCIEMENTS

*Mes remerciements Avant tout, louange à « ALLAH » qui m'a donnée la force, le courage et la patience de mettre ce modeste travail*

*La réalisation de ce mémoire a été possible grâce aux efforts de plusieurs personnes*

*Je tiens, avant tout, à exprimer ma profonde gratitude à mon rapporteur Monsieur, **Mr. ABIDI ABDELNABI** qui a été à l'origine de ce travail, pour sa disponibilité, pour sa confiance qu'il nous témoignée, ainsi que ses conseils précieux et ses encouragements qui nous ont beaucoup aidé à mener à bien la réalisation de ces travaux. Qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.*

*On n'oublie pas aussi de remercier l'équipe de travail au niveau de laboratoire de recherche contrôle de qualité au centre de recherche de la biotechnologie à Constantine*

*Nous remercier les membres de jury, chacun par son nom, qui m'a honoré en acceptant d'examiner ce travail.*

*« Pr .**FERTIKH** »      Et      « Mlle. **LARBI** »*

*De lire, commenter et juger cette mémoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou*

*De loin, à la réalisation de ce travail.*

# Dédicace :

*D'abord je tiens à remercier le bon Dieu qui nous a tout de nous  
a donné*

*La force pour réaliser ce modeste travail*

*Avec tout l'amour que l'on porte dans mon cœur je dédie ce fruit  
de tant d'années à la plus chère au monde, la grande fontaine de  
l'amour, la plus proche de mon cœur, ma mère **SOULEF**.*

*Le symbole de courage et de tendresse celle qui m'a suivie le long  
de ce chemin, mon père **SMAIL***

*A mes frères **SALAH ET NOUR ELLDINE**, sœurs **SAFA** et  
**CHAIMA***

*C'est un moment de plaisir de dédier cet ouvrage, à mes meilleures  
amis*

***YOUSRA, BESMA, HIBA.***

*A tout mes amis de ma promo « **GPE GIRLS** », en souvenir de  
nos états de rire et des bons moments, en souvenir de tout ce  
qu'on a vécu ensemble, j'espère de tout mon cœur que notre  
amitié durera éternellement.*

*Et bien sur je n'oublier pas mon cher binôme*

***MANEL TALHI***

*Qu'il a fait pour la réussite de cette graduation*

***RABAB***

# Dédécace

*Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma reconnaissance pour mes parents **Nabil** et **Samira** qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, pour tous les sacrifices qu'ils ont consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que DIEU vous protège et vous garde en bonne santé.*

*A ma chère tante **Lamis** et son mari **Lotfi** qui sont étaient toujours à mes cotés et faire le possible pour que je serai a l'aise*

*A mes très chères sœurs **Marwa** et **Safaa**, mes frères **Chouaib** et **Badr eddine** pour leur appui, encouragements et pour leur aide incessante.*

*A ma douce et mon partenaire **Rabab** pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble pendant cette année.*

*A mes adorables amies **Narimane** et **Shaima***

*A toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères.*

*A mes collègue et toute ma promotion GP 2016-2021.*

**HANIFA**

## **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 un hydro-distillateur type CLEVINGER ont obtient un rendement est égale 2.23% en 100g et l'huile végétal de cette espèce avec le Soxhlet on utilisant un solvant avec une polarité décroissantes (cyclohexane) où on obtient un rendement =15.98% de chaque 100g.

Après l'extraction on passe aux activités biologiques anti-oxydantes et anti-enzymatiques

L'activité anti-oxydante a été évaluée par les méthode : DPPH, ABTS<sup>+</sup>, CUPRAC ; FRAP et PHENANTROLINE et par deux methods enzymatique: antidiabétique, uréase et une activité anti-cholinestérase

Pour l'huile végétale nous avons fait les mêmes activités anti oxydantes, anti enzymatique et anti alzameur.

## **Abstract:**

Pimpinella Anisum is a medicinal plant belonging to the Apiaceae family, it is one of the oldest medicinal plants, The extracts were obtained by the exhaustion of the same plant material, in the first place we extracted the essential oil by a hydro-distiller type CLEVANGER obtained a yield = 2.23% in 100g and vegetable oil of this species with the Soxhlet using a solvent with decreasing polarity (cyclohexane) where a yield = 15.98% of each 100g is obtained.

After the extraction proceeds to anti-oxidant and anti-enzymatic biological activities

The antioxidant activity was evaluated by the method: DPPH, ABTS +, CUPRAC, FRAP and PHENANTROLINE and by two enzymatic methods: antidiabetic, urease and anti-cholinesterase activities.

For vegetable oil we did the same anti oxidant, anti enzymatic and anti alzimeur activities.

## نبذة مختصرة:

نبات الينسون هو واحدة من أقدم النباتات الطبية هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة Apiacea، إنه كذلك من المستخلصات عن طريق استنفاد نفس المادة النباتية، أولاً وقبل كل شيء استخرجنا الزيت العطري بواسطة تقطير مائي من نوع CLEVANGER حصلنا على محصول = 2.23% في 100 جرام وزيت نباتي من هذا النوع مع Soxhlet باستخدام مذيب بتناقص قطبية (سيكلوهكسان) حيث يتم الحصول على عائد = 15.98% من كل 100 جرام. بعد الشروع في الاستخراج إلى الأنشطة البيولوجية المضادة للأكسدة والأنزيمية. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بالطريقة: DPPH و ABTS + و CUPRAC و FRAP و PHENANTROLINE وطريقتين أنزيميتين الأنشطة المضادة لمرض السكر ومضادات الكولينستراز. بالنسبة للزيوت النباتية، قمنا بنفس الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للأنزيمات ومضادات الشبخوخة.

## Liste des figures

---

Figure I.1: herbes médicinales .....	4
Figure I.2: griffe de diable ( <i>Harpagophytum procubens</i> ).....	6
Figure I.3: les plantes médicinales .....	6
Figure I.4: plante de millepertuis.....	7
Figure I.5: extrait liquide de millepertuis.....	8
Figure I.6: bienfait des plantes médicinales au corps humains.....	9
Figure I.7: différents modes d'admissions des plantes médicinales.....	9
Figure I.8: extrait des plantes médicinales .....	12
Figure I.9: montage de l'hydrodistillation .....	17
Figure I.10: motage générale de l'entraînement à la vapeur d'eau. ....	18
Figure I.11 : montage de l'hydrodiffusion .....	18
Figure I.12 extraction par solvant organique .....	19
Figure I.13 montage de sohxlet .....	20
Figure I.14: extraction à froid.....	21
Figure I.15 : montage d'extraction ultrasens.....	22
Figure I.16 : extraits végétaux .....	23
Figure I.17: appareillage de press hydraulique.....	24
Figure I.18: montage d'extraction par presse mécanique .....	24
Figure II.1: transformation du radical DPPH° en DPPHH .....	32
Figure II.2: Piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> .....	33
Figure II.3: formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phenanthroline.....	33
Figure II.4: réduction du cuivre (CUPRAC).....	34
Figure II.5: formation de ferrocyanure de potassium.....	35
Figure II.6 : Piégeage du radical superoxide par le DMSO alcalin .....	35
Figure II.7: Chélation des ions de fer .....	36
Figure II.8: Piégeage du peroxyde d'hydrogene.....	37
Figure II.9: formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline.....	37
Figure II.10: Chélation du cuivre (CCA).....	38
Figure II.11: l'inhibition de l'autooxydation du Pyrogallol.....	39
Figure II.12: Piégeage du radical galvinoxyl (GOR).....	39
Figure II.13: réduction des ions Ag <sup>+</sup> par les poly phénols.....	40
Figure II.14 : formation de la fluorescence.....	40
Figure II.15 : réduction de Folin-Ciocalteu .....	41
Figure II.16. : Formation d'un complex a partire d'Al <sup>3+</sup> et les flavonoïdes .....	41

## Liste des figures

---

Figure II.17: complexes rouges .....	44
Figure II.18 inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) .....	44
Figure II.19: la production des mélanines .....	43
Figure II.20: Activité $\alpha$ -amylase.....	40
Figure II.21: Activité $\alpha$ -glucosidase .....	40
Figure II.22: la formation de l'ammoniac .....	46
Figure II.23: Formation de pigments bruns .....	45
Figure II.24: Cytotoxique.....	46
Figure II.25: l'inhibition de la dénaturation du BSA.....	46
Figure III.1 : l'anis vert (fleur, feuille, fruit) .....	50
Figure III.2 : mode de semis de l'anis vert .....	51
Figure III.3 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de <i>Pimpinella anisum</i> L .....	53
Figure IV.1 : Anis vert utilise.....	62
Figure IV.2 : L'analyse d'humidité avec l'appareil de dessiccateur.....	63
Figure IV.3 : la réalisation de la technique d'hydrodistillation de type Clevenger.....	64
Figure IV.4 : la formation d'huile essentielle .....	65
Figure IV.5: L'hydrolat de l'anis vert .....	65
Figure IV.6 : extraction par Soxhlet.....	68
Figure IV.7 : peser l'anis vert avec une balance électrique.....	68
Figure IV.8 : cartouche en cellulose placée dans un extracteur Soxhlet .....	69
Figure IV.9: Rotation de solvant à l'état initial .....	69
Figure IV.10: le solvant cyclohexane .....	69
Figure IV.11: huile végétale d'anis vert.....	69
Figure IV.12 : Chromatogramme obtenu par analyse GC/MS de l'huile essentielle de <i>Pimpinella anisum</i> à Tunisie .....	74
Figure V.1: les extraits dilués .....	77
Figure V.2: La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) par l'extrait d'HE et HF d'anis vert .....	79
Figure V.3: Valeurs des $CI_{50}$ du test DPPH pour les extraits des HE et HF d'anis vert..	79
Figure V.4 : La plaque de dosage de l'activité de piégeage du cation radical $ABTS^{+}$ des extraits HE et HF d'anis vert .....	81
Figure V.5 : valeur d' $IC_{50}$ de test ABTS d'HE et HF d'anis vert.....	81

## Liste des figures

---

Figure V.6: Plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits d'HE et HF d'anis vert .....	83
Figure V.7 : Valeurs d' $A_{0,50}$ du test CUPRAC pour les extraits d'HE et HF de l'anis vert	
Figure V.8: plaque de dosage de FRAP des extraits HE et HF de l'anis vert .....	84
Figure V.9: Valeurs des $A_{0,50}$ du test pouvoir réducteur pour les extraits HE et HF de l'anis vert .....	86
Figure V.10: plaque de dosage de phénontroline pour les extraits HE et HF de l'anis vert	92
Figure V.11: Valeurs des $A_{0,50}$ du test d'absorbance de phénontroline par HE et HF de l'anis vert .....	86
Figure V.12: plaque de dosage de alpha amylase de HE et HF d'anis vert.....	88
Figure V.13:valeurs d' $IC_{50}$ de test d'inhibition alpha amylase par HE et HF d'anis vert.	96
Figure V.14: plaque d'inhibition d'urease .....	90
Figure V.15: plaque de dosage Anti cholinestérase des extraits HE et HF d'anis vert .....	92
Figure V.16: valeurs de $IC_{50}$ de test d'inhibition d'Anti-cholinestérase des extraits HE et HF d'anis vert .....	92

## Liste des tableaux

---

Tableau III.1: Variation de la composition des huiles essentielles de graines de <i>Pimpinella anisum</i> L. en fonction de leurs provenances .....	53
Tableau III.2: Composition chimique de l'huile essentielle des graines d'anis vert .....	55
Tableau IV. 1 : systématique de l'anis vert utilisée .....	62
Tableau IV. 2 : conditions pour réaliser la méthode d'hydrodistillation d'anis vert .....	64
Tableau IV.3: Présentation de l'organoleptique de l'huile essentielle obtenue .....	66
Tableau IV. 4 : de l'organoleptique de l'huile végétale obtenue.....	71
Tableau IV.5 : résultat et discussion final pour les 2 extractions .....	71
Tableau IV.6 : résultat de propriété chimique et physique avec référence indienne .....	74
Tableau IV. 7: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>pimpinella anisum</i> .....	75
Tableau IV.8: La composition de l'huile essentielle de l'anis vert de différentes régions du monde .....	75
Tableau V.1 : Inhibition du radical DPPH par les extraits HE et HF de l'anis vert .....	79
Tableau II.2 : Inhibition du cation radical ABTS <sup>++</sup> par les extraits HE et HF d'anis vert	81
Tableau II.3: La capacité antioxydante de réduction du cuivre des extraits HE et HF de l'anis vert.....	83
Tableau II.4: Absorbance du pouvoir réducteur FRAP par les extraits de l'anis vert ...	85
Tableau II.5 : absorbance de phénantroline par l'extrait HE et HF de l'anis vert.....	86
Tableau II.6 : inhibition de l'alpha- amylase des extraits HE HF d'anis vert .....	88
Tableau II.8: préparation des solutions tampons.....	91
Tableau II.9: activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	92
Tableau II.9: Récapitulatif sur toutes les activités examinées .....	93

## Liste des abréviations

---

**A** : Ampère

**A<sub>0.5</sub>** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance

**ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**AChE** : Acétylcholinestérase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**BChE** : Butyrylcholinestérase

**BHA** : Butylhydroxyanisole

**BHT** : Butylhydroxytoluène

**BSA** : Albumine de sérum bovin

°C : Degré Celsius

**CI<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition à 50%

**CPL/SM** : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie masse

**CUPRAC** : Complexe cuivre- néocuproïne

**CT**: chimotype

**CPG** : chromatographie phase gazeuse

**CPG-SM** : chromatographie phase gazeuse couplé par spectroscopie de masse

**DPPH** :  $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl

**DTNB** : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

**ERO** : production d'espèces réactives de l'oxygène

**FCR** : Folin-Ciocalteu

**FRAP** : Pouvoir réducteur

g : Gramme

**GOR** : Radical Galvinoxyl

**HE** : huile essentielle

**HV** : huile végétal

**HF** : huile fixe

**HD** :hydrodistillation

**H.E.B.B.D** : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie

**Kg** : Kilogramme

**m** : Masse

**M** : Molaire

**MA** : maladies d'Alzaimneur

**mg** : Milligramme

**min** : Minute

## Liste des abréviations

---

**ml** : Millilitre

**mM** : Millimolaire

**MM** : Masse molaire

**mmol** : Millimole

**nm** : Nanomètre

**pH**: Potentiel hydrogène

**ppm** : Partie par million

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

**ROS** : source respiratoire d'oxygène

**s** : Seconde

**SD** : Standard de déviation

**SM** : Spectrométrie de masse

**TAC** : capacité anti-oxydante totale

**TEAC** : Capacité anti-oxydante équivalente Trolox

**TFC** : Contenu total en flavonoïdes

**TPC** : Contenu total en polyphénols

**TR** : Temps de rétention

**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

**U** : Unité

**UV** : Ultraviolet

**µg** : Microgramme

**µl** : Microlitre

**µmol** : Micromole

**Z** : Charge

## Sommaire

Liste des Figures .....	VI
Liste des Tableaux .....	XIV
Liste des abréviations .....	XV
Introduction Générale .....	1

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Généralité sur les plantes médicinales, huiles essentielles et huiles végétales, et la différence entre eux

I.1.introduction .....	03
I.2. Historique. ....	03
I.3.La phytothérapie .....	08
I.4.L'aromathérapie .....	10
I.5.Huile essentielle. ....	10
I.5.1.Historique.....	10
I.5.2.Définition des huiles essentielles.....	11
I.5.3.Composition chimique des huiles essentielles .....	12
I.5.4.La méthode générale d'obtentions une huile essentielle.....	13
I.5.5Caractérisation des huiles essentielles. ....	14
I.5.6.Les propriétés des huiles essentielles selon leurs types.....	15
I.5.7.Techniques d'extractions des huiles essentielles .....	16
a) Distillation.....	16
b) Extraction au solvant organique.....	19
c) Extraction à froid .....	20
d) Extraction en CO2 supercritique.....	21
e) Extraction assisté par ultrasons .....	21
I.6.Les huile végétale (huile fixe Hf) .....	22
I.6.1.Définition sur les HF .....	22
I.6.2.Technique d'extraction d'HF.....	23
a) Par presse hydraulique.....	23
b) Par presse mécanique (expeller) .....	24

# Sommaire

---

c) Par centrifugation (pour les fruits oléagineux) .....	25
d) Par extraction du solvant .....	25
I.6.3.Oxydation des HF .....	25
II.6.4.Méthode de conservation d'HF .....	26
I.7.Déférence entre HE et HF .....	26
I.8.Conclusion .....	27

## Chapitre II : Présentation sur les activités biologique

II.1.Introduction .....	28
II.2. Activité antioxydante des huiles essentielles .....	28
II.2.1. Différents types de radicaux libres. ....	28
II.2.2.origine et production des espèces réactifs oxygéné .....	28
II.2.3. Dommages oxydatifs des radicaux libres .....	29
II.2.4. Moyens de défense contre les radicaux libres .....	30
II.2.5. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants .....	32
II.2.5.1.Piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH .....	32
II.2.5.2.Piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> .....	32
II.2.5.3.Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> phénolthroline .....	33
II.2.5.4 .Capacité antioxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC).....	34
II.2.5.5.Evaluation du pouvoir réducteur .....	34
II.2.5.6. Piégeage du radical superoxide par le DMSO alcalin .....	35
II.2.5.7.Chélation des ions de fer.....	36
II.2.5.8. Piégeage du radical hydroxyl .....	36
II.2.5.9.Piégeage du peroxyde d'hydrogen .....	37
II.2.5.10.Chélation des ions de fer avec la phénanthroline .....	37
II.2.5. 11.Piégeage du radical superoxide (Pyrogallol).....	39
II.2.5.12. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR) .....	39
II.2.5.13. Nanoparticules d'argent (méthode SNP) .....	39
II.2.5.14. Capacité d'absorbance du radical oxygene (ORAC).....	40
II.2.5.15. Total phénolique et flavonoïde .....	40
II.2.5.16. Total tannins .....	41

## Sommaire

---

II.3. Activités enzymatiques .....	42
II.3.1. Anti-cholinestérase (AChE, BChE) .....	42
II.3.2. Activité tyrosinase .....	43
II.3.3. Activité $\alpha$ -amylase .....	43
II.3.4. Activité $\alpha$ -glucosidase.....	44
II.3.5. Activité urease .....	45
II.3.6. Activité anti-brunissement .....	45
II.4. Autres activités .....	46
III.4.1. Activité cytotoxique (Brimp shrimp).....	46
III.4.2. Activité anti-inflammatoire .....	46
III.4.3. Evaluation de la phytotoxicité .....	46
III.4.4. Evaluation du facteur de protection solaire (SPF).....	47
II.5. Conclusion .....	47

### Chapitre III : Description d'une espèce végétale *Pimpinella anisum*

III.1. Introduction.....	48
III.2. Historique .....	48
III.3. Description botanique de l'anis vert .....	49
III.4. L'Habitat de l'anis vert.....	50
III.5. Cultivé et récolte de l'anis vert .....	51
III.6. Rendement de <i>Pimpinella anisum</i> .....	51
III.7. Composition biochimique de la graine d'anis vert .....	52
III.7.1. Lipides.....	52
III.7.2. Huiles essentielles.....	53
III.7.3. Composés phénoliques.....	54
III.8. Composition nutritionnelle de l'anis et constituants chimiques .....	54
III.9. Etude photochimique de <i>Pimpinella anisum</i> L .....	54
III.10. Usage d'anis vert .....	55
III.10.1. Usage culinaire .....	55
III.10.2. L'utilisation en médecine thérapeutique .....	56
III.10.3. Usage compagnonnage .....	56
III.10.4. Autres utilisations.....	56

## Sommaire

---

III.11. Les méthodes d'extraire l'huile de l'anis vert .....	56
III.12.Activités Biologiques de Pimpinella anisum L .....	57
III. 12.1.Activité parasiticide et insecticide.....	57
III. 12.2Activité antifongique... ..	57
III.13.Activité antibactérienne .....	57
III. 13.1.Activité antiulcéreuse .....	57
III. 13.2.Activité antioxydant .....	58
III.14.. L'effet bénéfique de Pimpinella anisum L sur le système... ..	58
III.15. Toxicité de Pimpinella anisum L .....	69
III.16.conclusion .....	60

## Partie expérimentale

### Chapitre IV : Extraction et caractérisation systématique d'HV et HE

IV.1. Introduction.....	61
IV.2. Matériel végétal .....	61
IV.3. Taux d'humidité .....	63
IV.4.Choix de la méthode d'extraction des huiles.....	63
IV.4.1. l'extraction par l'hydrodistillation .....	63
IV.4.2. Extraction par cyclohexane selon la méthode de Soxhlet pour l'extraction d'huile végétale .....	67
IV.5. Caractéristique physique et chimique d'anis vert .....	71
IV.5.1. l'indice de saponification.....	71
IV.5.2. Indice d'iode .....	72
IV.6.Analyse chromatographie de l'HE de Pimpinella anisum.....	74
IV.7.Conclusion. ....	75

### Chapitre V : Mis en point des activités biologiques

V.1. Introduction .....	77
V.2 Activités anti-oxydantes .....	77

# Sommaire

---

V.2.1-Activité antiradicalaire au DPPH .....	78
V.2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>+</sup> .....	80
V.2.3. Activité biologique : CUPRAC. ....	82
V.2.4activités biologique : Reducing power (FRAP) .....	84
V.2.5. Activité biologique : Phenanthroline .....	85
V.2.6. Test d'inhibition de l'alpha- amylase.....	87
V.2.7.Activités biologiques : UREASE .....	89
V.2.8. Activité biologique : Anti-cholinestérase .....	90
V.3.Conclusion. ....	93
CONCLUSION GENERALE .....	95
BIBLIOGRAPHIQUES .....	98
ANNEX .....	102

# Introduction général

La médecine par les plantes remonte à l'aube de l'humanité. Aux temps préhistoriques, les chasseurs-cueilleurs ne se limitaient pas à consommer des plantes, ils s'en servaient aussi pour se soigner. Pas d'écrits bien sûr, mais des fouilles archéologiques ont dévoilé qu'il y a 35000 ans les hommes de Cro-Magnon connaissaient certaines plantes comme la camomille, le chanvre, l'ortie, l'achillée millefeuille, le lin, le pavot et la valériane.

Les plantes médicinales jouent un rôle important dans la prévention et le traitement des maladies humaines. Cette relation entre les plantes et l'homme s'est développée et de nombreuses plantes ont été utilisées comme remède traditionnel naturel. Ces dernières années, les effets pharmacologiques des plantes médicinales ont été considérés comme une source potentielle de futurs médicaments à base de plantes [A].

Dans les systèmes biologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN), telles que l'anion super-oxyde ( $O_2^-$ ) et le monoxyde d'azote (NO), peuvent endommager l'ADN et entraîner l'oxydation des lipides et des protéines dans les cellules. Naturellement, un système antioxydant présent dans le corps humain peut éliminer ces radicaux libres, ce qui permettrait de maintenir l'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités anti-oxydantes de l'organisme [B].

Des études sur la toxicité exercée par des antioxydants synthétiques ont entraîné une augmentation de la demande des antioxydants naturels, en particulier d'une source végétale, dans le secteur alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, puisqu'ils peuvent être utilisés en tant que substituants naturels pour ces antioxydants de synthèse [C].

La présence des antioxydants naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins dans les plantes peut fournir une protection contre un certain nombre de maladies, et leur utilisation a été inversement associée à la morbidité et à la mortalité dues aux troubles dégénératifs [D].

Les plantes médicinales sont une bonne source de produits naturels pouvant avoir une activité antimicrobienne, antidiabétique, anti-Alzheimer et anti-inflammatoire en raison de leur richesse en métabolites secondaires tels que les terpènes, les alcaloïdes et les composés

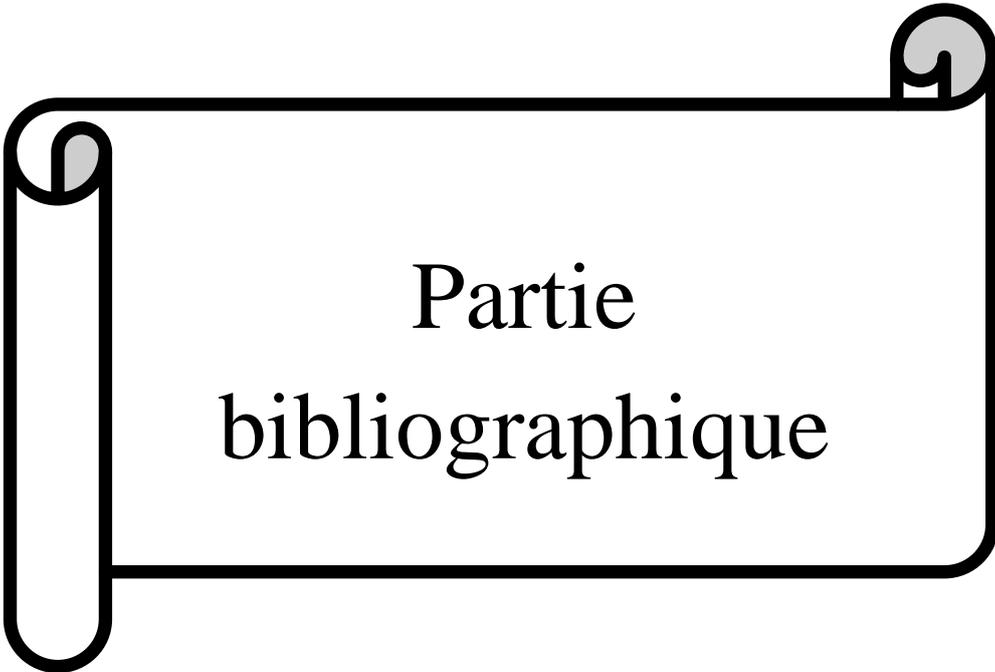
phénoliques. Ces métabolites secondaires peuvent être analysés par deux méthodes de choix ; la CPL/SM et la CPG/SM, elles sont très spécifiques et précises pour la séparation et la détection des composés.

Ce travail a pour objectif principal de faire une extraction des huiles essentielles et végétale **d'Anis Vert** et l'évaluation des activités biologiques ce manuscrit est structuré en deux parties

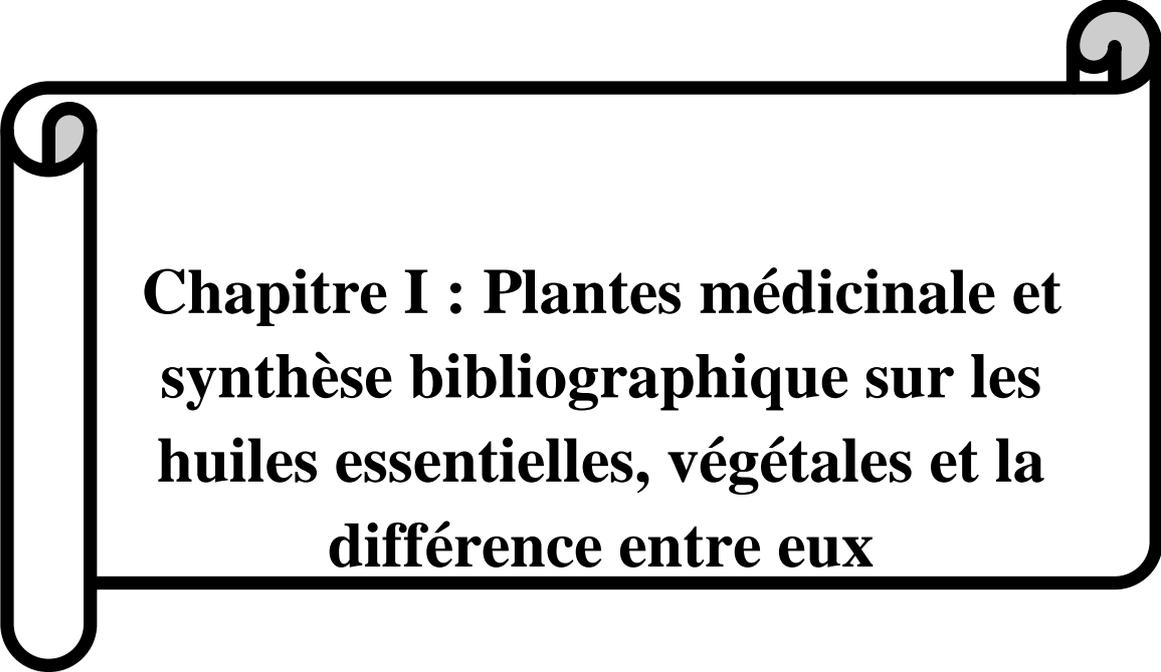
La première partie c'est un état de connaissance contient trois chapitres :

- Le 1<sup>er</sup> chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les plantes médicinales, les huiles essentielles et végétales.
  - Le deuxième chapitre explique le fondement théorique des activités biologiques
  - Le 3<sup>ème</sup> chapitre c'était un inventaire bibliographique sur matériel végétale choisi dans notre étude.
- La deuxième partie contient deux chapitres expérimentaux :
- L'extraction d'HE et HV d'Anis Vert avec les analyses physico-chimique et les propriétés organoleptique
  - Le dernier chapitre c'était sur les activités biologiques d'HE et HV d'Anis Vert

Le manuscrit est achevé par une conclusion résumera l'ensemble des résultats issus de cette étude, les perspectives de recherche concernant toute les étapes à réaliser dans l'avenir proche, pour but de confirmer l'efficacité de HE et HF d'anis vert et la liste de références bibliographique.



Partie  
bibliographique



**Chapitre I : Plantes médicinales et  
synthèse bibliographique sur les  
huiles essentielles, végétales et la  
différence entre eux**

# Chapitre I

---

## I.1. Introduction :

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des milliers d'année, en premier temps sont utilisé d'une façon brute ou on l'appelle la phytothérapie cette discipline exploite les divers principe actifs de l'ensemble des plantes ,elle est la mère de l'aromathérapie qui désigne d'une manière général l'utilisation des composés aromatique des plantes souvent sous formes des huiles essentielles dans une optique de prévention et de soulagement de certains troubles et d'apaisement, ainsi les huiles végétales qui sont extrait à partir des grains et fruits des plantes.

## I.2. Historique :

*« Pour connaître une science, il faut en connaître le passé »*

### **Auguste Comte**

A l'origine, il semble que la transmission du savoir se fait de façon orale et se perpétue avec la tradition. Née entre 3500 et 3000 av J.-C., l'écriture cunéiforme apparue avec la civilisation sumérienne permet la conservation et la diffusion des connaissances. Ce qui, à ce jour, paraît être le document

le plus ancien témoignant de l'art de guérir, est la Pharmacopée sumérienne de Nippur datée de 2200 av J.-C... Il s'agit d'un recueil de plantes médicinales et de remèdes issus du monde animal et minéral, gravés sur une tablette d'argile. Les produits végétaux sont les plus représentés on y retrouve par exemple : le saule, la jusquiame, la rue, la ciguë... [1]

Les végétaux possèdent des vertus considérables à même de traiter et guérir de nombreux maux et pathologies comme les troubles du sommeil, les troubles osseux, nerveux, musculaires, cardio-vasculaires, digestifs, ou encore dermatologiques et ORL... Ils sont également très prisés en cosmétique, ainsi que dans nos maisons. Ils sont donc un véritable atout pour l'Homme.

Car l'utilisation des plantes à des fins médicinales (ou même alimentaires) requiert des connaissances exactes et rigoureuses. Il ne s'agit pas de faire n'importe quoi, car mal utilisées, elles pourraient très vite devenir dangereuses où chaque variété possède des propriétés qui lui sont propres parfois thérapeutiques, parfois toxiques. Les différentes parties d'une seule et même plante peuvent même s'avérer chimiquement diamétralement opposées et avoir des conséquences très bénéfiques, ou au contraire être extrêmement nocives pour la santé.

# Chapitre I

---

On peut utiliser les graines, les feuilles, les pétales, les tiges, le pollen, la sève, l'écorce, etc.... **figure I.1** on le faire sécher, réduire en poudre, faire bouillir (infusion, décoction), utiliser en cataplasmes, ou encore consommer tel quel.



**Figure I.1: Herbes médicinales**

Les plantes c'est la vie, depuis la nuit des temps, l'Homme consomme et utilise des végétaux pour se nourrir, se soigner et construire des habitations ou même s'habiller.

Après des siècles d'observation et de connaissances assimilées, l'être humain a su en comprendre et tirer les bienfaits des plantes pour la santé. Cette science c'est une véritable médecine, c'est la phytothérapie ou la **médecine par les plantes et elle est la plus** ancienne des médecines du monde.

Selon la définition de la Pharmacopée Française (11ème édition en vigueur). annexe1  
«Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée Européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques ».

Pour être reconnue comme « médicinale » une plante doit être inscrite soit à la Pharmacopée Européenne (8e éd.), soit à la Pharmacopée Française (11e éd.).

Il existe 546 plantes médicinales inscrites à la pharmacopée française 11ème édition, dont 148 peuvent être vendues en dehors du monopole pharmaceutique... [2]

# Chapitre I

---

Le pharmacien a donc le monopole de la délivrance de 398 plantes médicinales... [3]

Une plante médicinale, contrairement à une plante « classique » possède donc des principes actifs responsables d'une action thérapeutique mais aussi responsables d'effets indésirables appelés toxicité, tout comme les médicaments chimiques.

En effet il n'est pas par hasard que plus d'un tiers des médicaments allopathiques utilisés aujourd'hui soit issus de plantes médicinales. Nous pouvons citer comme exemple l'extraction de la morphine à partir du Pavot à opium, l'acide acétylsalicylique du saule, la quinine de la Chinchon mais aussi le tamoxifène provenant de l'If du pacifique ou la vinblastine extraite de la pervenche de Madagascar.

L'appellation de plante médicinale a donc toute sa place dans le monde du médicament sachant qu'une grande partie des médicaments utilisés actuellement sont issus des plantes soit par copie de la molécule active « naturelle » par héli synthèse, soit par extraction de celle-ci... [4]

Parmi les plantes médicinales nous pouvons distinguer deux moyens d'utilisation distincts :

- La plante entière ou une partie de la plante est utilisée en l'état sans avoir subi d'extraction physico-chimique préalable. Le terme de totum est alors employé pour désigner l'ensemble ou la partie du végétal utilisé.

Le totum contient de nombreuses familles d'actifs agissant en synergie. Le patient peut l'ingérer sous forme de gélules contenant la poudre de plante, de comprimés ou de tisane (extraction des composés hydrosolubles).

Exemple : la racine d'harpagophytum ou bien ce qu'on appelle « griffe de diable » (Harpagophytum procubens L.) **figure I.2**

Cette utilisation de la plante médicinale se rapproche des utilisations originelles car on utilise la partie de la plante dans sa globalité et c'est la synergie des actifs contenus dans sa drogue végétale qui permet son effet thérapeutique.



**Figure I.2: Griffe de diable (*Harpagophytum procubens*)**

- La plante entière ou une partie de la plante subit une extraction physico-chimique. On obtient alors un extrait aqueux, hydro- alcoolique selon le solvant d'extraction utilisé. et extrait liquide subit généralement une étape de dessiccation. On obtient alors un extrait sec.



**Figure I.3: plantes médicinales**

# Chapitre I

---

L'extrait sec est concentré en principes actifs de la même famille chimique.

On utilise donc la plante pour en extraire son principe actif principal en vue d'un effet thérapeutique précis. C'est une thérapie beaucoup plus évoluée car on cible une molécule précise provenant de la plante médicinale et on l'extrait pour obtenir un concentré de ce principe actif.

Exemple : l'extrait sec hydro alcoolique de millepertuis (*Hypericum perforatum* L.).



**Figure I.4: plante de millepertuis**

Selon le mode d'extraction utilisé nous pouvons retrouver plusieurs indications pour la même plante car des principes actifs différents seront extraits. Le millepertuis est ainsi retrouvé sous plusieurs formes **Figure I.5:**

- ✓ L'extrait sec ainsi que la drogue végétale pulvérisée qui sont utilisés pour les états dépressifs mineurs à modérés
- ✓ L'extrait liquide par extraction dans une huile végétale qui est utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires sur la peau (coups de soleil notamment). [5]



**Figure I.5: extrait liquide de millepertuis**

Aujourd'hui, la plante médicinale est rarement utilisée dans son entier. On utilise une ou plusieurs parties de plantes pouvant chacune avoir une utilisation différente et qui sont décrites dans la monographie de la plante médicinale.

L'utilisation des plantes dans le domaine médicinales on l'appel « Phytothérapie » c'est une science à la fois ancestrale et moderne, cette appellation viennent du grec et signifie : «soigner par les plantes».

### **I.3 : La phytothérapie :**

C'est l'art d'utiliser les plantes au service de la santé et du bien-être **Figure I.6.** À la différence de l'aromathérapie qu'elle est basée sur des extraits concentrés des végétaux - les huiles essentielles- la phytothérapie utilise directement les plantes partiellement ou dans leur intégralité. Elle repose en partie sur une pratique traditionnelle, fondée sur l'utilisation ancestrale et localisation des plantes. Les plantes médicinales renferment de nombreux actifs (plus de 250) qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces actifs ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments.



**Figure I.6: bienfait des plantes médicinales au corps humains**

Autre point important, il tout autant nécessaire de connaître la période adéquate de leur récolte afin d'entier la meilleur parti, que de connaître leur mode d'administration selon ce que l'on souhaite traiter **Figure I.7**: décoction, infusion, macération, en poudre ou en gélules pour les plus modernes, par voie interne, par voie externe...

Pour cela, il existe nombre de livres et documents divers sur le sujet, mais le mieux reste encore de consulter un spécialiste, phytothérapeute ou herboriste.



**Figure I.7: Différents modes d'admissions des plantes médicinales**

# Chapitre I

---

Voici quelques exemples de plantes fréquemment utilisées en phytothérapie :

- Le thym en cas de bronchite, contre la toux
- La lavande contre les insomnies, l'anxiété ou contre les mites !
- L'aloès vera en cas de brûlures, même au 3ème degré
- La camomille ou la menthe contre les maux de tête
- La myrtille comme anti-diarrhéique
- Le gingembre contre la migraine ou le mal des transports
- Le safran, le ginseng ou le millepertuis contre la déprime...

Comme remarque la phytothérapie est elle-même à ne pas confondre avec la phytothérapie, qui consiste à dépolluer les sols, assainir l'air intérieur et épurer les eaux usées au moyen de plantes vasculaires, d'algues ou de champignons.

Autrement dit, la phytothérapie est la mère de l'**aromathérapie**. Elles se distinguent par leur technique et leur mise en pratique. Mais malgré ces différences, ces deux sciences n'en ont pas moins la même approche et le même but : utiliser les plantes au service de la santé et du bien-être.

## **I.4 :L'aromathérapie :**

**La** notion d'**aromathérapie** a été décrite pour la première fois en 1928 par un scientifique français, René-Maurice GATTEFOSSE. Elle correspond à l'utilisation des **huiles essentielles** à des fins thérapeutiques. Il s'agit d'une médecine douce et naturelle, qui repose sur les activités pharmacologiques des différents composants présents dans les huiles essentielles. [6]

## **I.5.Les huiles essentielles(HE) :**

### **I.5.1.Historique :**

L'utilisation des huiles essentielles commence bien avant notre ère, dans l'Égypte Ancienne. Des papyrus trouvés à travers les siècles certifient de l'existence de « plantes de vie » à partir de 4500 avant Jésus-Christ.

Leur utilisation était sacrée, la médecine s'attachant à une croyance en la magie et aux symboles.

Les huiles essentielles sont utilisées à cette époque dans plusieurs domaines : la médecine, la parfumerie, les cosmétiques et les embaumements. Le parfum est dans les

# Chapitre I

---

coutumes de séduction et de religion, l'application en baume est monnaie courante, et non exclusive aux rois et aux riches. La religion est vraiment liée à l'utilisation des huiles essentielles lors de l'embaumement des corps, afin de rapprocher l'humain des dieux après sa mort. Grâce aux macérations des bandelettes dans les huiles essentielles avant de recouvrir les corps, certains d'entre eux ont été particulièrement bien conservés durant des siècles.

Les égyptiens pratiquaient une forme sommaire de distillation, en utilisant la macération et l'essorage. Les plantes étaient mélangées à de l'eau bouillante. Après ajout de tissus dans cette mixture, les égyptiens laissaient macérer la préparation plusieurs jours, afin que les essences s'imprègnent dans le textile. Afin de les récupérer, les tissus étaient essorés manuellement.

Concernant les modes d'administration de l'époque, nous en retrouvons certaines n'ayant pas changé. Généralement prises en pommade et baume, l'application cutanée était la plus répandue. Cependant, l'utilisation par voie orale (pure ou en tisane) était également appliquée.

La civilisation égyptienne est aujourd'hui considérée comme la créatrice des huiles essentielles. Elle a influencé de nombreuses cultures et civilisations, apportant ses savoir-faire en médecine en Grèce, dans l'empire Romain et dans l'ensemble du bassin méditerranéen. [7]

## **I.5.2.Définition des huiles essentielles :**

Le terme « huile essentielle » est défini à la fois par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires. (Voir annexe)

Les huiles essentielles sont les **essences** volatiles extraites des plantes aromatiques par un procédé de distillation. Selon l'espèce végétale dont elles sont extraites, différentes **vertus thérapeutiques** peuvent leur être attribuées. Très puissantes, leur utilisation nécessite des connaissances et un certain nombre de précautions.

Aussi, sont des extraits naturels de plantes puissants et d'une extraordinaire efficacité, tant sur le plan de la santé que de la beauté et du bien-être. En les combinant, il est possible de mettre

# Chapitre I

---

au point des synergies aromatiques inédites dont les vertus et propriétés répondent à des besoins ciblés comme par exemple le renforcement des défenses immunitaires, la relaxation, la stimulation, le soulagement de douleurs articulaires et musculaires, l'atténuation de l'effet "peau d'orange", ...

On peut profiter des bienfaits des huiles essentielles sous réserve de strictement respecter les précautions d'usage. Pour profiter pleinement de leurs vertus il est recommandé d'utiliser exclusivement des huiles essentielles **chémotypées** (CT), (Voir l'annexe) 100% pures et naturelles, botaniquement et biochimiquement définies (H.E.B.B.D). Préférez des huiles essentielles issues de l'Agriculture Biologique, de culture sauvage de régions éloignées des zones polluées ou issues de cultures traditionnelles contrôlées dans des zones rurales non polluées. Les huiles essentielles s'utilisent dans des compositions à diffuser dans l'atmosphère, produits de beauté, les huiles de massage, dans le bain ou même en cuisine.

Les enfants peuvent bénéficier des huiles essentielles à condition de respecter des règles strictes quant aux dosages et sous suivi médical. **Figure I.8**



**Figure I.8:extrait des plantes médicinales**

### **1.5.3. Composition chimique des huiles essentielles:**

Une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives.

# Chapitre I

---

C'est un mélange plus ou moins complexe de composés chimiques, généralement liquides à la température ambiante (30 à 40° C). Il a été démontré que les huiles essentielles sont constituées principalement de quatre grands groupes de composés:

- les trapézoïdes (mono et sesquiterpènes principalement).
- les dérivés benzéniques.
- les hydrocarbures aliphatiques et les composés non spécifiques pouvant contenir dans leurs structures des atomes d'azote ou de soufre

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte [8]

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). [9]

La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles [10]. Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente, on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes

## **I.5.4. La méthode générale d'obtention une huile essentielle :**

Les **huiles essentielles** sont obtenues par un procédé particulier, la distillation à la vapeur d'eau à basse pression. Les plantes aromatiques sont placées dans une cuve, qui est ensuite traversée par de la vapeur d'eau. L'eau utilisée doit être une eau de source, peu ou non calcaire, pour éviter le recours aux détartrants chimiques. La vapeur d'eau extrait l'essence de la plante sous forme d'un mélange gazeux.

A la sortie de la cuve, la vapeur d'eau enrichie d'huile essentielle traverse un serpentin et condense. Le liquide s'accumule dans un essencier, où l'huile essentielle, de densité différente, se sépare de l'eau. Après distillation, les huiles essentielles doivent être filtrées et stockées dans des cuves hermétiques inaltérables. La mise en bouteille doit se faire exclusivement dans des flacons en verre opaque brun ou bleu, pour préserver les huiles essentielles de la lumière et de l'oxygène.

# Chapitre I

---

La qualité des **huiles essentielles** est contrôlée par plusieurs tests effectués en laboratoire pour identifier les substances aromatiques présentes dans l'huile essentielle (jusqu'à 450 composés), déterminer les proportions des composants majoritaires et étudier leurs activités pharmacologiques, par exemple leur **pouvoir antimicrobien**.

## I.5.5 Caractérisation des huiles essentielles

Une **huile essentielle** peut être caractérisée par les critères de qualité suivants :

- La dénomination botanique binomiale, c'est-à-dire le nom latin de l'espèce végétale utilisée pour obtenir l'huile essentielle.
- L'origine géographique de la plante aromatique, car la composition des huiles essentielles peut fortement varier selon l'environnement dans lequel la plante a poussé avant sa récolte.
- Le mode de culture (traditionnelle ou biologique), qui conditionne la présence éventuelle de pesticides ou de polluants organiques.
- La partie de la plante utilisée, qui influence la composition de l'huile essentielle.

La plante entière ou toutes les parties de la plante peuvent être distillées :

- ✓ Les fleurs (oranger) ;
- ✓ Les feuilles (eucalyptus) ;
- ✓ Les écorces (cannelle) ;
- ✓ Les bois (santal) ;
- ✓ Les racines (vétiver) ;
- ✓ Les rhizomes (curcuma) ;
- ✓ Les fruits secs (anis) ;
- ✓ Les graines (muscade).

A savoir d'autres extraits des plantes aromatiques peuvent être obtenus et ne doivent pas être confondus avec des huiles essentielles, car leurs applications sont différentes où on trouve :

- Les hydrolats aromatiques ou les eaux distillées végétales correspondent à la vapeur d'eau condensée après le procédé de distillation. Ils sont notamment utilisés à des fins cosmétiques.
- Les essences d'agrumes obtenues par un procédé d'expression, c'est-à-dire la rupture mécanique des poches à essence des zestes frais d'agrumes.
- Les absolues ou extraits alcooliques aux fleurs sont obtenues grâce au procédé d'enfleurage, qui consiste à placer des fleurs au contact de graisses absorbantes. Ces graisses se saturent progressivement en essence. Ces extraits sont particulièrement utilisés en parfumerie.
- Les concrètes correspondent aux essences extraites par différents types de solvants.

## **I.5.6 Les propriétés des huiles essentielles selon leurs types :**

Les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours. Outre leur action curative, elles opèrent de manière préventive en stimulant le système immunitaire afin que votre organisme lutte plus efficacement contre les infections bactériennes et virales.

Parmi les propriétés les plus connues, on citera la propriété antiseptique.

A l'heure où les germes microbiens deviennent de plus en plus résistants, ce qui implique pour l'industrie pharmaceutique de trouver des antibiotiques de plus en plus puissants (mais aussi de plus en plus destructeurs de la flore saprophyte responsable de notre immunité), les huiles essentielles offrent une véritable alternative.

Leur efficacité se révèle en effet stable dans le temps et la preuve est faite tous les jours de leur grande efficacité, là où certains antibiotiques échouent désormais.

En fait, les vertus antiseptiques des plantes sont connues depuis des milliers d'années. Les hommes se sont ainsi aperçus, par exemple certains aromates, comme le thym, la sarriette ou la cannelle freinaient la fermentation des aliments.

### **Voici des différentes propriétés :**

- Analgésique (soulage la douleur par une action sédatrice sur les nerfs),
- Antibiotique (lutte contre les infections internes),
- Antidépresseur (lutte contre les états dépressifs),
- Antiémétique (soulage les états nauséux et élimine l'envie de vomir),
- Anti-inflammatoire (réduit les inflammations),
- Antispasmodique (prévient et soigne les douleurs spasmodiques de l'intestin et de l'utérus),
- Antisudoral (réduit la transpiration),
- Antitoxique (agit comme un anti-poison),
- Antiviral (inhibe ou élimine les virus),
- Aphrodisiaque (augmente la libido),
- Astringent (tonifie les tissus),
- Carminatif (expulse les gaz intestinaux),
- Cholagogue (stimule la sécrétion biliaire),
- Cicatrisant (accélère et améliore la cicatrisation),
- Déodorant (réduit les odeurs),

# Chapitre I

---

- Dépuratif (purifie le sang),
- Digestif (stimule et facilite la digestion. Soulage l'indigestion),
- Diurétique (augmente la quantité d'urine),
- Emménagogue (stimule et régule les règles),
- Expectorant (élimine les excès de mucus présent dans les bronches),
- Fébrifuge (réduit la fièvre),
- Fongicide (prévient et détruit les infections fongiques. [11])

## I.5.7 Techniques d'extraction des huiles essentielles :

De nombreuses techniques sont utilisées pour l'extraction des substances aromatiques. Particulièrement difficiles, et des plus délicates, cette opération a pour but de capter les produits élaborés par le végétal et cela tout en veillant à éviter d'en altérer la qualité. Pour percevoir les difficultés rencontrées durant l'opération d'extraction, il suffit de garder présent à l'esprit la rapidité avec laquelle se dégage, puis disparaît, ou se dénature, le parfum d'une fleur, même la plus odorante, dont on a froissé les pétales. Les techniques d'extraction doivent donc, tout en tenant compte des coûts d'obtention liés au rendement, au temps passé et au matériel utilisé, viser à résoudre au mieux les difficultés dans le but d'obtenir des extraits de haute qualité, c'est-à-dire, les plus proche possible de l'essence originelle.

On fait appel à plusieurs méthodes :

- La distillation
- L'extraction aux solvants organiques
- L'expression à froid et d'autres méthodes ... [12] [13].

a) **Distillation** : La distillation à la vapeur d'eau est une méthode ancienne et très répandue pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Elle est simple dans son principe et utilise un équipement peu coûteux. Elle se présente sous trois (03) variantes : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur et hydrodiffusion. [14]

### a).1. Hydrodistillation :

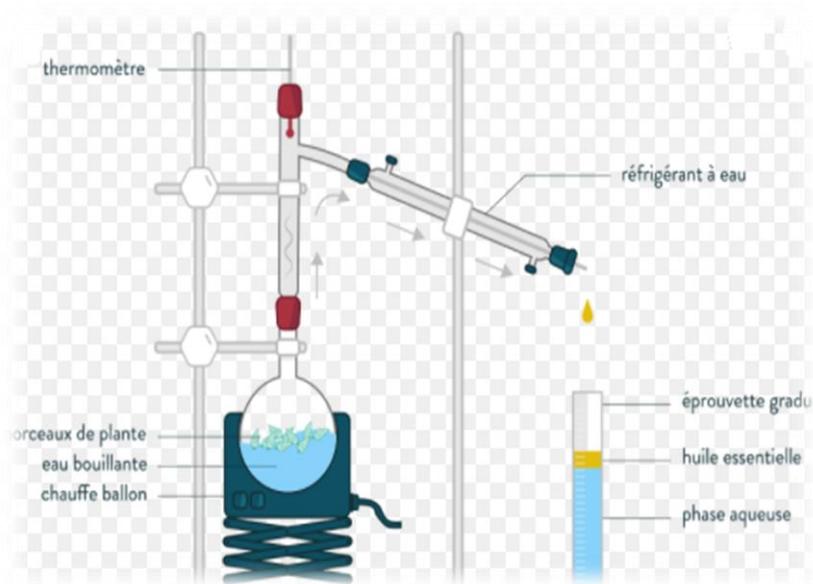
L'hydrodistillation est une méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Cette méthode consiste à immerger directement la partie de la plante à extraire dans l'eau chauffée jusqu'à l'ébullition pendant 3 heures.

L'huile essentielle est évaporée avec le vapeur d'eau. Ces derniers sont hétérogènes sont alors condensées à l'aide d'un réfrigérant. Le distillant est ensuite récupéré dans un erlenmeyer. [15]

# Chapitre I

L'eau et molécule aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparant en une phase aqueuse et une phase organique : **l'huile essentielle**. **Figure I.9**

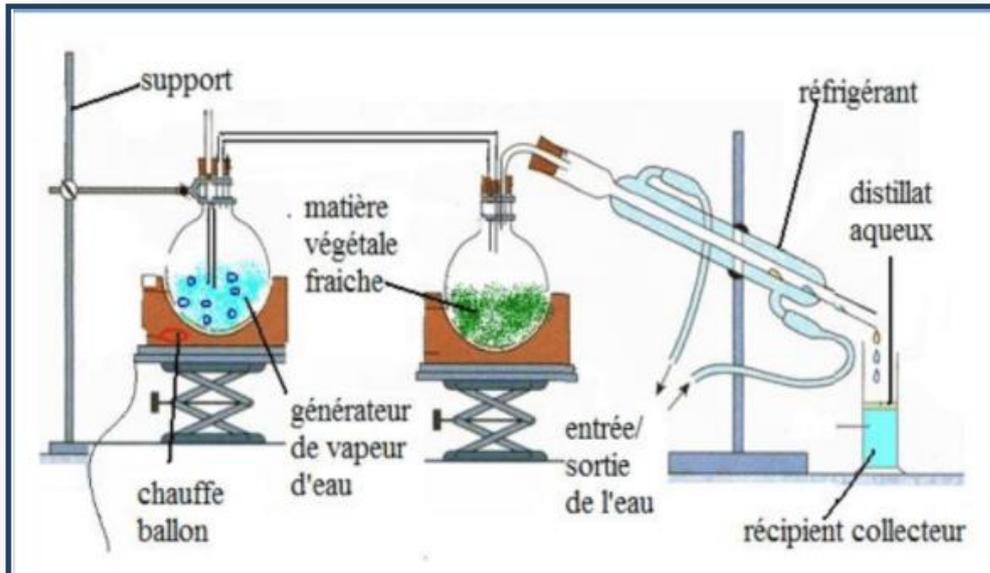
La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation (cohobation). La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement, mais également sur la composition de l'extrait. Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînaibles l'hydrodistillation à pression élevée représente une bonne alternative. [16]



**Figure I.9: Montage de l'hydrodistillation**

## a) .2.Entrainement à la vapeur d'eau :

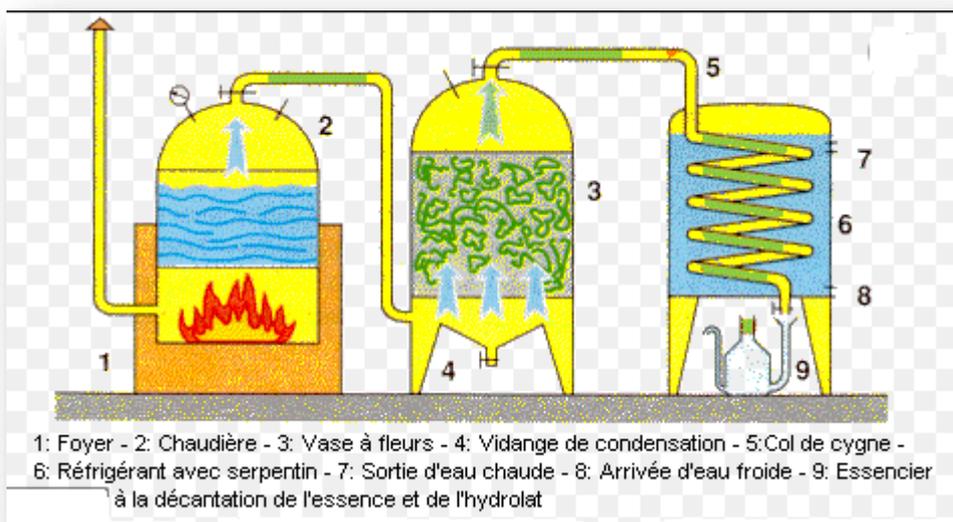
Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats de l'extraction. Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale fraîche à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse le matériel, les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent, la vapeur circule et chasse la plupart des ses composés parfumés volatils. Puis traverse un tube froid où elle sera condensée. Après 3 heures, le distillat est récupéré dans une fiole réceptrice puis séparé puis séparé en une phase aqueuse et phase organique. [17] **Figure I.10**



**Figure I.10. Montage générale de l'entraînement à la vapeur d'eau**

### a).3 : Hydrodiffusion

Consiste à pulser de la vapeur d'eau à faible pression « 0.02-0.15 bar » à travers la masse végétale, de haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie. [18] **Figure I.11**



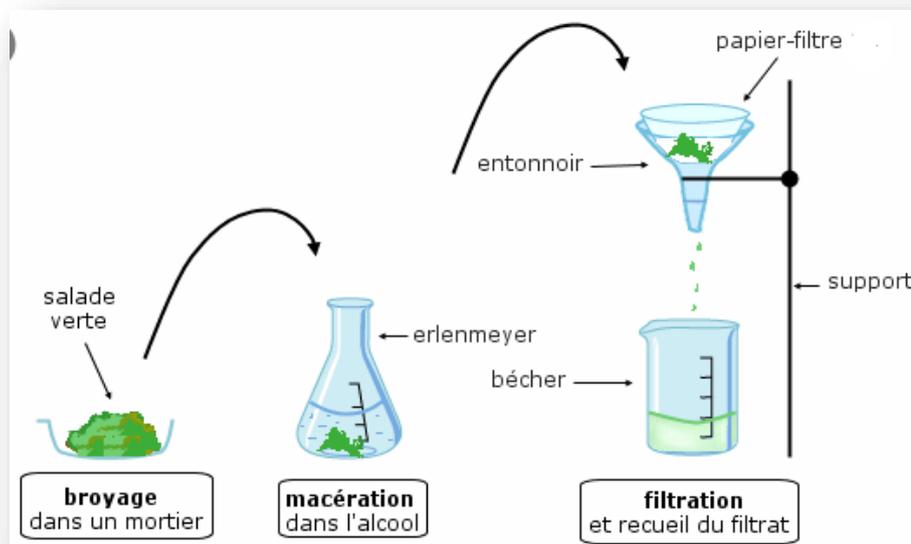
**Figure I. 11. Montage de l'hydrodiffusion**

# Chapitre I

## b) Extraction aux solvants organiques :

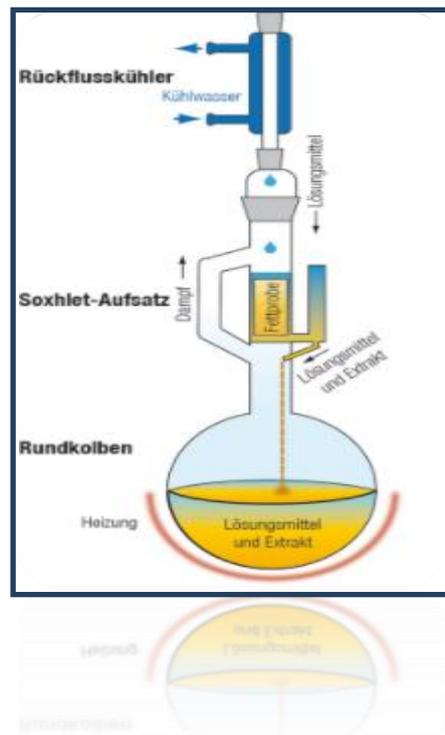
Consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatique, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales et obtiendra une « absolue ». **Figure I.12**

Le solvant choisi, en plus l'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'O<sub>2</sub>, sa température sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. [19]



**Figure I.12. Extraction par solvant organique**

Parmi les solvants utilisés, sont le méthanol, l'éthanol et l'éther de pétrole l'appareillage le plus utilisé est celui de Soxhlet. [16] **Figure I.13**



**Figure I.13: montage de sohxlet**

### c) Extraction à froid :

Les huiles essentielles de fruits d'agrumes sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid [16]

Le principe de cette technique est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. L'émulsion d'essence et d'eau isolée par décantation ou centrifugation. [18] **figure I.14**

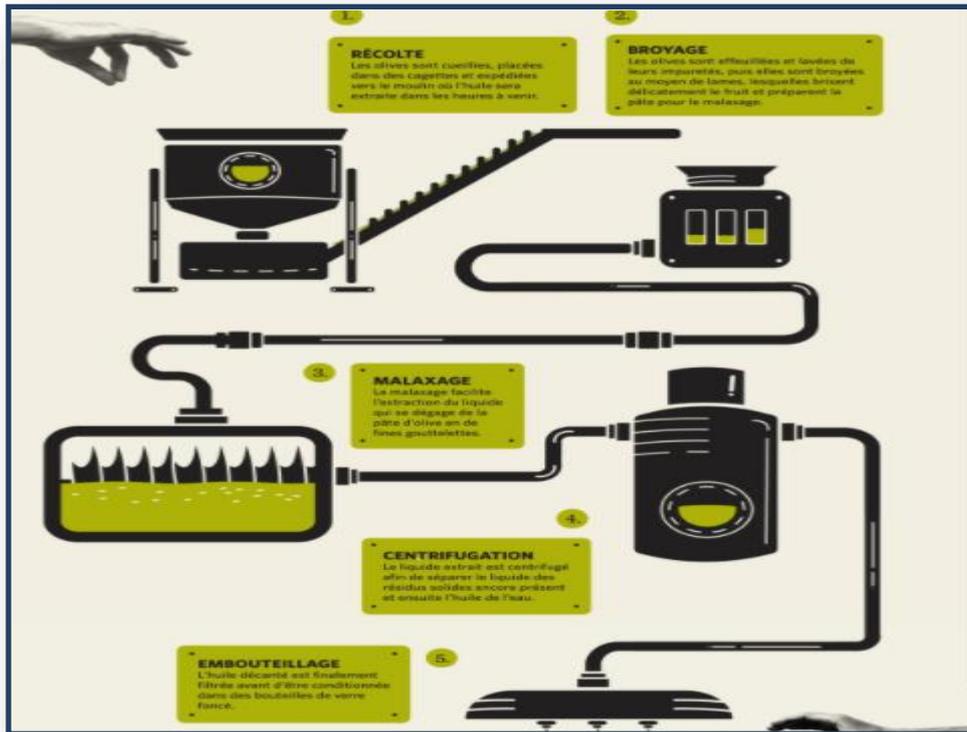


Figure I.14: Extraction à froid

#### d) Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique :

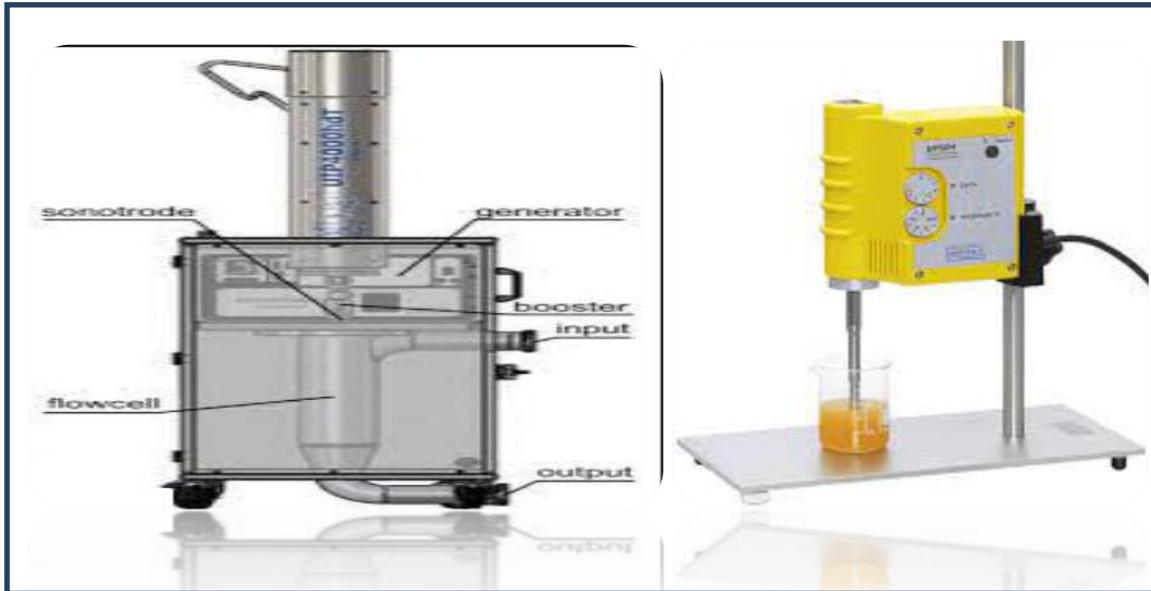
Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid, des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique sous pression et à température supérieure à 35C°, le dioxyde de carbone est employé principalement comme un fluide supercritique parce que c'est un solvant sain, non combustible, peu coûteux, inodore, sans couleur, insipide, non-toxique, et aisément disponible. Sa viscosité basse lui permet de pénétrer la matrice pour atteindre le matériel à extraire, et sa basse chaleur latente d'évaporation est un moyen élevé vitalité qui peut être facilement enlève sans laisser un résidu de solvant. [20]

#### e) Extraction assistée par ultrasons :

L'extraction des composés bioactifs sous l'irradiation d'ultrason est des hautes techniques d'extraction qui peuvent offrir un rendement élevé dans des périodes plus courtes, manipulation simplifiée, consommation de solvant réduite, température et absorption d'énergie faible. Les matériels est placé dans une chambre d'extraction qui est un cylindrique d'acier inoxydable fermée avec des couvercles à visser combinés à un système dynamique et rempli de solvant. La chambre est émergée dans un bain chauffé, ensuite l'échantillon est exposé le gonflement des cellules ou décomposition de paroi de la cellule, qui permet des taux élevés de diffusion à travers la paroi cellulaire. Le solvant éliminé des

# Chapitre I

extraits par évaporation sous vide sur un évaporateur rotatif, puis gelé et lyophilisé pour enlever l'eau. [21] **Figure 15**



**Figure I.15: montage d'extraction ultrasens**

## **I.6.les huiles végétales (huile fixe Hf) :**

### **I.6.1 Définition sur les HF :**

Les huiles végétales sont extraites à partir des graines et fruits des plantes oléagineuses **Figure I.16** Elles contiennent de nombreuses vitamines et acides gras essentiels pour une alimentation riche variée. [22] Les huiles végétales sont très utilisées en cosmétique, où leurs propriétés nourrissantes, hydratantes et protectrices feront des merveilles. Elles seront aussi très utiles en aromathérapie avec des propriétés thérapeutiques spécifiques, ou tout simplement parce qu'elles font d'excellentes bases de dilution des huiles essentielles. Certaines possèdent également de nombreux bienfaits nutritionnels et seront donc idéales en cuisine. [23] Même si elles sont beaucoup moins puissantes que les huiles essentielles, certaines huiles végétales ont toute leur place dans votre aromathèque. Leurs propriétés thérapeutiques leur permettront de venir en soutien de leurs cousines les huiles essentielles, tout en diluant leurs principes actifs. Voici donc quelques huiles

# Chapitre I

végétales et macérâts huileux à visée aromathérapeutique : **Huile** de soja. **Huile** de colza & moutarde. **Huile** de tournesol.

- Autres **huiles végétales**.
- **Huile** de palmiste.
- **Huile** d'arachide.
- **Huile** de coton....



**Figure I.16:extraits végétaux**

## **I.6.2.Technique d'extraction des d'HF:**

La plupart des huiles végétales sont issues de fruits d'oléagineux ou de graines. Afin de produire la « substantifique huile », ces dernières subissent une préparation : les feuilles et les tiges sont retirées, les graines sont décortiquées et parfois chauffées légèrement afin de fluidifier l'huile et en augmenter le rendement.

### **a) Par presse hydraulique (avec scrutins) :**

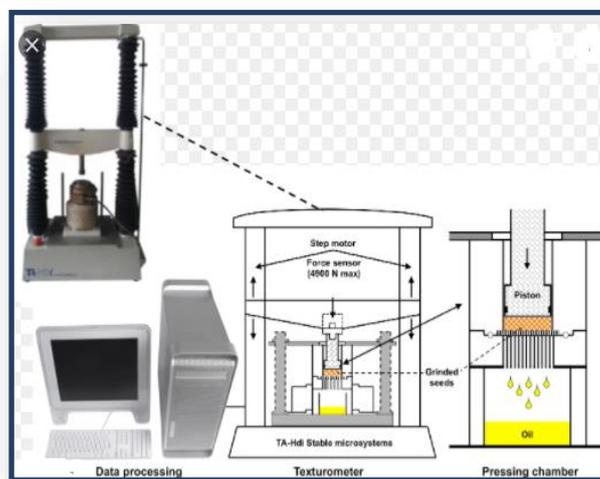
Les fruits secs sont pressés à froid afin d'offrir une huile végétale vierge d'une excellente qualité **Figure I.7** Les huiles ainsi produites sont étiquetées « première pression à froid » : un choix à privilégier pour garantir une alimentation saine et un procédé respectueux de la nature.



**Figure I.17: appareillage de press hydraulique**

**b) Par presse mécanique (expeller) :**

Les graines sont triturées et légèrement échauffées. On obtient une huile pure dénuée de toute substance étrangère et ayant conservé les qualités diététiques de la graine. C'est la méthode la plus couramment employée.



**Figure I.18: montage d'extraction par presse mécanique**

## c) Par centrifugation (pour les fruits oléagineux) :

Il s'agit de séparer l'huile de la pulpe du fruit (amandes, noisettes, noix).

## d) Par extraction au solvant :

L'hexane (solvant issu du pétrole) est destiné à dégraisser le résidu des graines broyées. Puis la distillation vise à éliminer le solvant afin d'obtenir l'huile. Si cette méthode s'avère la plus rentable (car elle permet de récolter une quantité bien supérieure d'huile), elle est néanmoins la moins saine puisqu'il est très probable que des résidus de solvants se retrouvent dans l'huile ainsi obtenue.

Précision : les fabricants n'ont pas l'obligation de mentionner le mode d'extraction. Par conséquent, l'absence de mention « extraction au solvant » s'avère être un indicateur de ce mode de production. [23]

## I.6.3 Oxydation des HF:

On définit souvent les huiles végétales par leur potentiel oxydatif, il s'agit d'une **dégradation des acides gras** qui composent l'huile et qui vont donc **altérer la qualité de l'huile**. Cette oxydation peut être engendrée par différents facteurs :

- **L'oxygène de l'air** : une huile en contact avec l'air peut à long terme altérer la structure moléculaire des acides gras et ainsi modifier la structure de l'huile. Ce phénomène d'altération de l'huile, s'explique par la fixation des atomes d'oxygène sur les fonctions acide carboxylique de l'acide gras.
- **La lumière** : les rayons UV sont des facteurs de dégradations des liens entre les atomes formant les acides gras. Ainsi, une exposition trop fréquente à la lumière peut entraîner la formation de radicaux libres et des mutations altérant la qualité de l'huile.
- **Les interactions avec le contenant** : les emballages en métal, comme le fer ou le cuivre, peuvent réagir avec le contenu et relarguer des molécules qui vont dégrader l'huile.
- **La chaleur** : il est connu que la chaleur agit comme un catalyseur dans ces réactions, c'est-à-dire qu'elle va favoriser la dénaturation des acides gras et donc entraîner l'oxydation de l'huile. Même si certaines huiles sont moins sensibles à la chaleur que d'autres, il est important de les conserver dans un endroit frais.
- Ces facteurs peuvent donc favoriser l'oxydation des huiles et par conséquent entraîner des **réactions allergiques**, des **boutons** (car une huile oxydée devient très comédogène) et une **odeur de rance** lors de l'utilisation. Il est donc important de

# Chapitre I

---

conserver vos huiles à l'abri de la chaleur et de la lumière, mais également dans un endroit frais et sec afin d'éviter toutes contaminations de micro-organismes et dans un contenant adapté ! Une huile vierge extraite par première pression à froid est plus riche et aura donc tendance à se dégrader plus rapidement que des huiles minérales. C'est pourquoi il est essentiel de soigner la conservation de vos huiles végétales.

- Voici quelques exemples d'huiles végétales classées selon leur stabilité à l'oxydation :
- **Excellente** : l'huile de Coco, l'huile de Jojoba ou encore l'huile de Sésame.
- **Bonne** : l'huile de Noyaux d'Abricot, l'huile d'Argan ou l'huile d'Amande Douce.
- **Sensible à très sensible** : le macérat huileux d'Arnica, l'huile de Bourrache ou l'huile de Germe de Blé.

## I.6.4 Méthode de conservation d'HF :

Pour mettre toutes les chances d'utiliser les huiles végétales le plus longtemps possibles, prenez soin de les **conserver toujours à l'abri de la lumière, dans un flacon fermé**. Essuyer bien le goulot du flacon après chaque utilisation pour éviter contamination et oxydation. Et préférez des contenant de taille adaptée : plus l'huile est en contact avec l'air et plus elle s'oxydera vite.

## I.7. Différence entre HE et HF :

L'huile végétale est un corps gras à la texture huileuse. Elle peut être extraite de fruits secs, de graines ou de fleurs (exemple :huile d'olive, l'huile d'amande, huile de tournesol ...) .Elle contient des vitamines et des acides gras, les huiles végétales possèdent des propriétés nutritives, protectrices, adoucissantes et régénératrices bénéfiques à la peau. Elles sont donc prisées dans le domaine de la cosmétique où elles peuvent être employées sans contre-indication. Elles peuvent être utilisées et/ou consommées pures.

Les huiles végétales alimentaires servent à agrémenter, entre autres, nos salades estivales. Les huiles végétales peuvent aussi servir de carburant (huile de colza, etc.) ou de combustible (lampes à huile, etc.)

Les huiles végétales servent de base à la dilution des huiles essentielles.

L'huile essentielle n'est en réalité, au sens chimique du terme, pas une huile. C'est ainsi que l'on nomme imparfaitement un concentré de substances volatiles issu de fleurs, de tiges, de racines ou de feuilles de plantes, lequel s'obtient souvent par distillation.

Les huiles essentielles présentent des propriétés thérapeutiques (tonifiante, digestive, apaisante, etc.) qui varient en fonction de leur origine. Elles doivent généralement être diluées - dans une huile végétale par exemple - et peuvent également être inhalées. Mais il faut

# Chapitre I

---

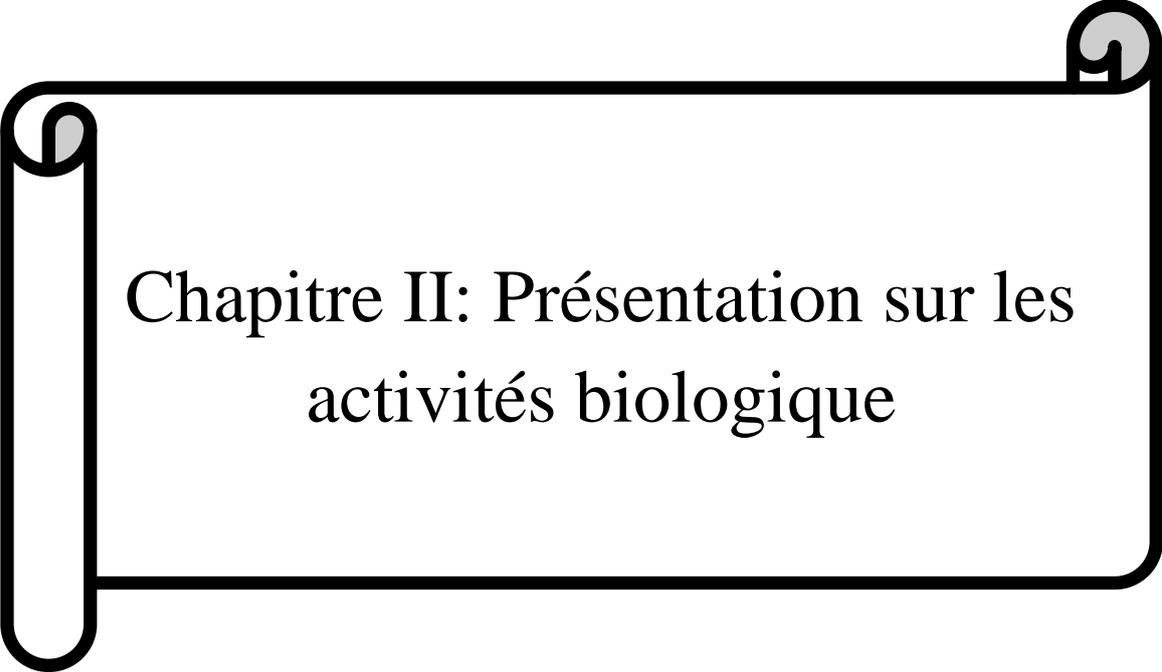
faire attention car il existe des contre-indications à l'usage des huiles essentielles, certains de leurs composants chimiques pouvant se révéler dangereux pour les enfants en bas âge, pour les femmes enceintes ou bien lorsque l'on expose au soleil (en cas de présence d'aldéhydes photosensibilisants) [24]

## **I.8. Conclusion :**

Les plantes médicinales sont utilisées pour ses propriétés thérapeutique, leurs efficacités relève de leurs composés.

On peut obtenir les bienfaits de ces plantes sous formes des huiles essentielles, des huiles végétales, des extraits aqueux ..., avec les différentes méthodes d'extractions.

L'utilisation des plantes médicinales demande des précautions ils ne doivent pas les nég



Chapitre II: Présentation sur les  
activités biologique

### **II.1.Introduction :**

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des cénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [24].

Dans ce chapitre on va faire une petite étude descriptive sur les différentes activités anti-oxydantes ainsi que les activités enzymatique.

### **II.2.Activité anti-oxydante des huiles essentielles**

#### **II.2.1 Différents types de radicaux libres :**

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou, un pouvoir oxydant fort. Il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe [25]

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ), le radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ) et le radical alkoxyde ( $RO\cdot$ ). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet  $L'O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [26].

#### **II.2.2 Origine et production des espèces réactives oxygénées :**

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduit et produisent des anions superoxyde, de l'eau oxygénée et éventuellement des radicaux hydroxyles [27].

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogène ou endogène s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la

## Chapitre II

---

réduction de cet oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Ce dernier donne le ( $H_2O_2$ ) par dismutation. L' $O_2^-$  et  $H_2O_2$  participent à la libération d'hypochlorite sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase. **(28)**

A côté de ces sources majeures des ROS, d'autres sources existent. Les sources cytosoliques, constituées essentiellement de peroxydase qui constitue une source importante de la production cellulaire de  $H_2O_2$  **(29)**, la xanthine oxydase qui produit de l' $O_2^-$  et  $H_2O_2$  **(Groussard, 2006)** et les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques).

A cela, s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres. On peut citer entre autres, les rayonnements UV capables de générer des anions superoxyde ou de l'oxygène singlet, les rayons X ou  $\gamma$  sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants **(Tamer, 2003)** les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS **(Favier, 2003 ; Wang et al, 2008)**. Les fumées de combustion (cigarettes), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter **(Pincemail et al., 2001 ; Lee et al., 2006 ; Pincemail & Defraigne, 2004)**.

Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon **Aurousseau (2002)**, des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

### **II.2.3.Dommages oxydatifs des radicaux libres :**

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » **(Rahman, 2003)**. Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN **(Aurousseau, 2002 ; Valko et al, 2006)**. Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies **(Aruoma, 1998)**. Parmi lesquelles les maladies d'Alzheimer de Parkinson, de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites, les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque **(Jha et al., 1995)**, les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau **(Georgetti et al., 2003)** et le cancer **(Ali et al., 2003)**

### II.2.4. Moyens de défense contre les radicaux libres :

D'après Halliwell (1994), un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Virot, 2004).

- Prévention à plein temps :

Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

- **Détoxification active :**

suite à une attaque oxydante Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (Valko et al., 2006).

Super oxyde dismutase (SOD) Dans l'être humain, il y a  $\gamma$  isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (Landis et Tower, 2005). Moyens de défense contre les radicaux libres

D'après Halliwell (1994), un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Virot, 2004).

- **Prévention à plein temps :**

Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH

## Chapitre II

---

physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

### ➤ **Détoxification active :**

Suite à une attaque oxydante Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes

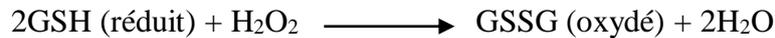
- Super oxyde dismutase (SOD) Dans l'être humain, il y a  $\gamma$  isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**)
- Catalase :

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al. 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ .



### • **Glutathion peroxydase :**

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



### ➤ **Détoxification passive :**

Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense.

Elle inclut tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko et al, 2006**).

La vitamine E est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (**Pryor, 2000 ; Valko et al. 2006**). Durant la réaction antioxydante, l' $\alpha$ -tocophérol est converti en radical  $\alpha$ -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce

## Chapitre II

radicalaire (radical peroxy) : vitamine C, caroténoïdes, acide lipoïque, alumine et composés phénoliques.

### II.2.5. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydant. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude: la méthode au DPPH, Cuprac, ABTS, Phénontroline et méthode de FRAP et pour les activités enzymatique on fait l'Urease,  $\alpha$  amylase et l'activité anti alzameur

#### II.2.5.1. Piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH

L'activité du DPPH est mesurée selon le protocole décrit par Blois, le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue

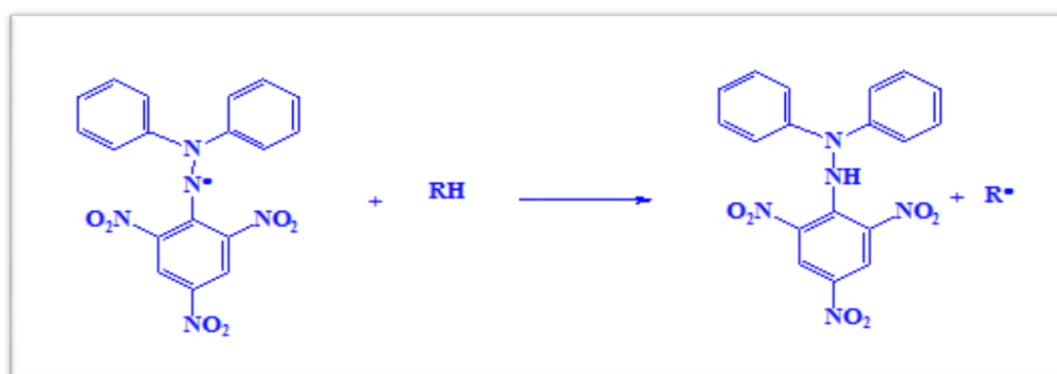


Figure II. 1 : transformation du radical DPPH° en DPPHH

#### II.2.5.2. Piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup>

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la consommation du radical ABTS<sup>•+</sup> suite à l'addition d'un échantillon antioxydant. Ce dernier réagit avec ABTS<sup>•+</sup> (en excès) par transfert d'électrons pour redonner l'ABTS incolore

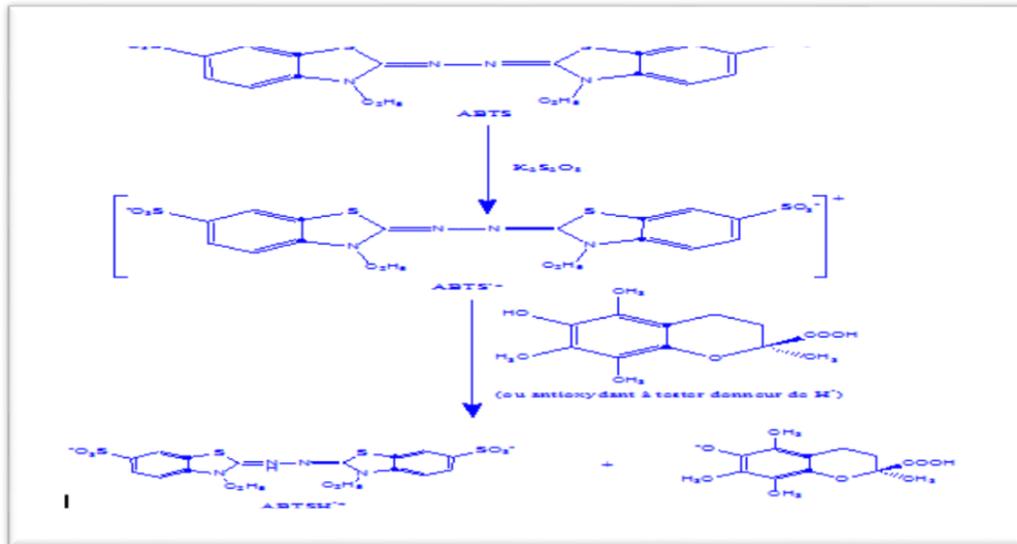


Figure II.2 : Piégeage du radical  $ABTS^{\bullet+}$

### II.2.5.3. Activité de réduction par la formation du complexe $Fe^{+2}$ -phenanthroline

Le fer aqueux, sous sa forme ferreuse réduite ( $Fe^{+2}$ ), peut être déterminé par Spectrophotométrie à partir de son complexe intensément coloré avec la 1,10-phénanthroline en solution acide (pH 3-4), par la réaction de **Figure II.3**

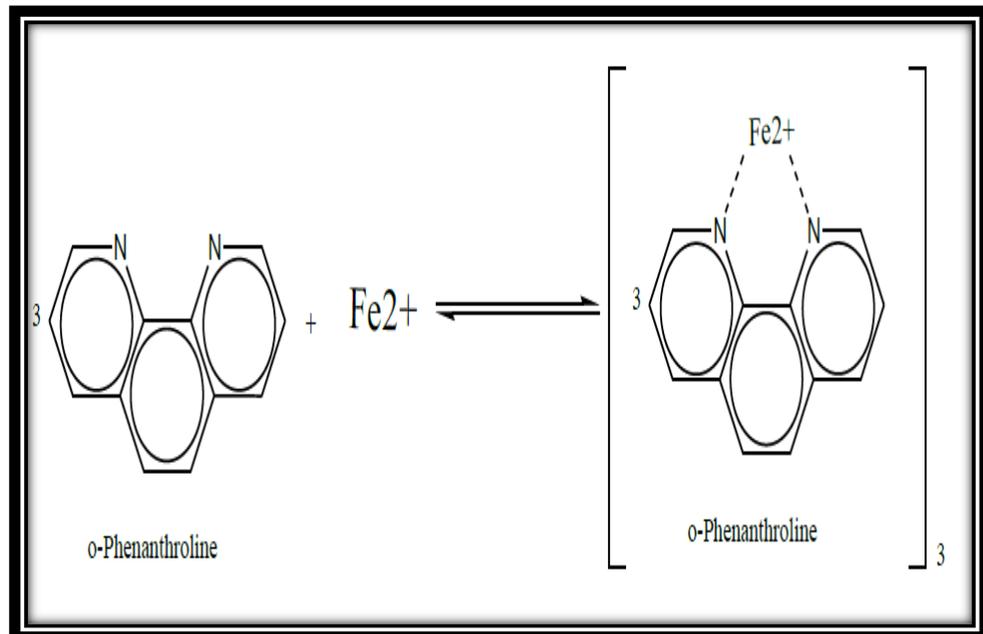


Figure II.3 : la formation du complexe  $Fe^{+2}$ -phenanthroline

### II.2.5.4. Capacité anti-oxydante par la réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*) est basée sur la mesure l'absorbance du complexe cuivre- néocuproïne  $[\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}_2]$  formé en raison de la réaction redox entre un antioxydant et le complexe cuivre-néocuproïne. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit produisant ainsi un complexe chromogène de  $\text{Cu}^+\text{-Nc}$  (Figure 10), cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm.

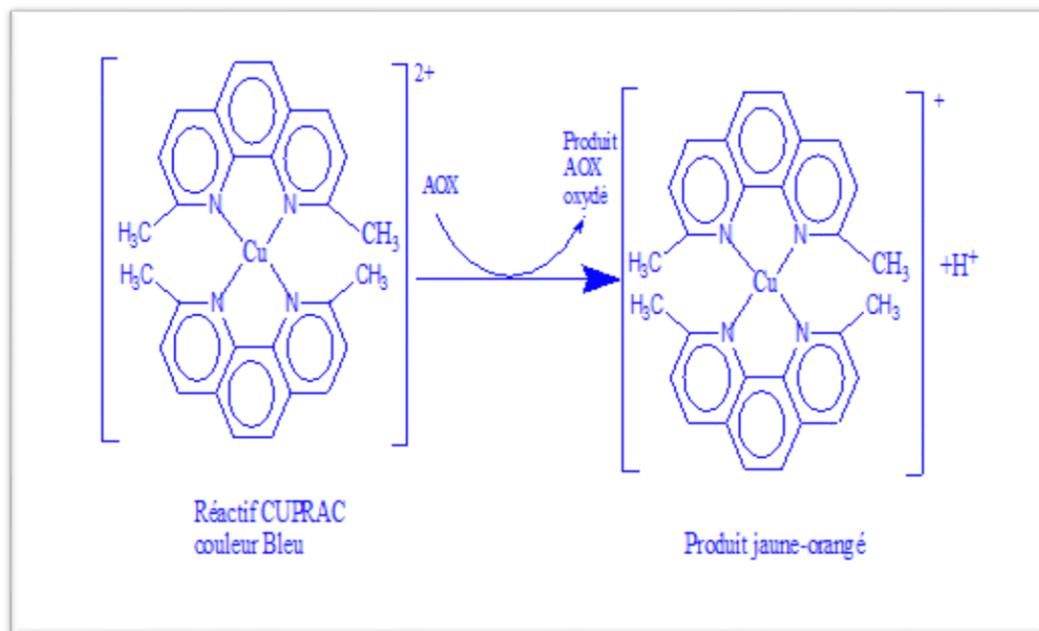
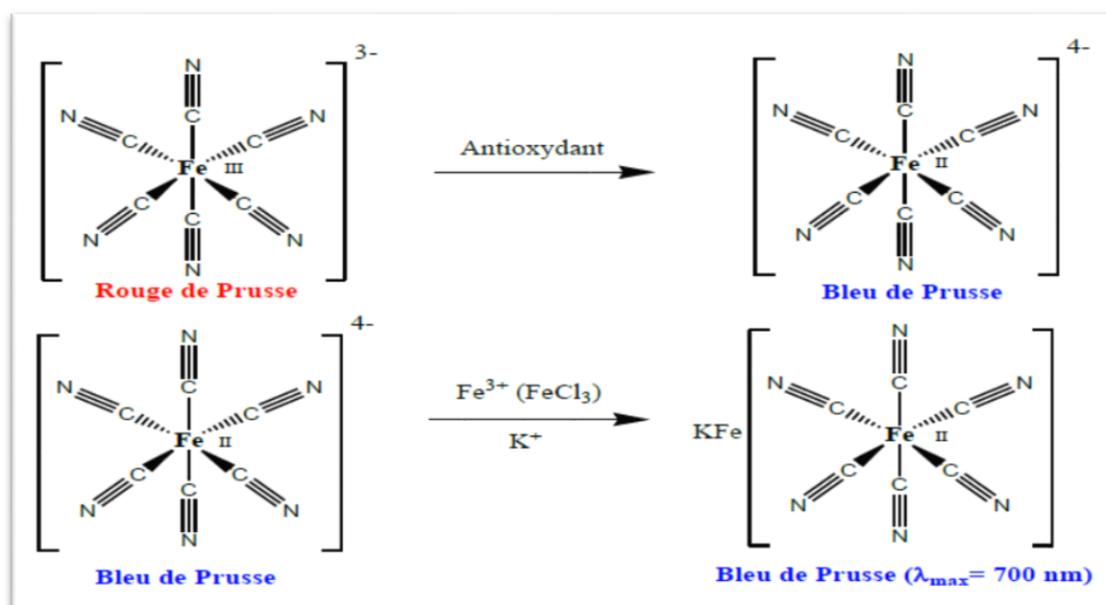


Figure II.4 : la réduction du cuivre (CUPRAC)

### II.2.5.5. Evaluation du pouvoir réducteur

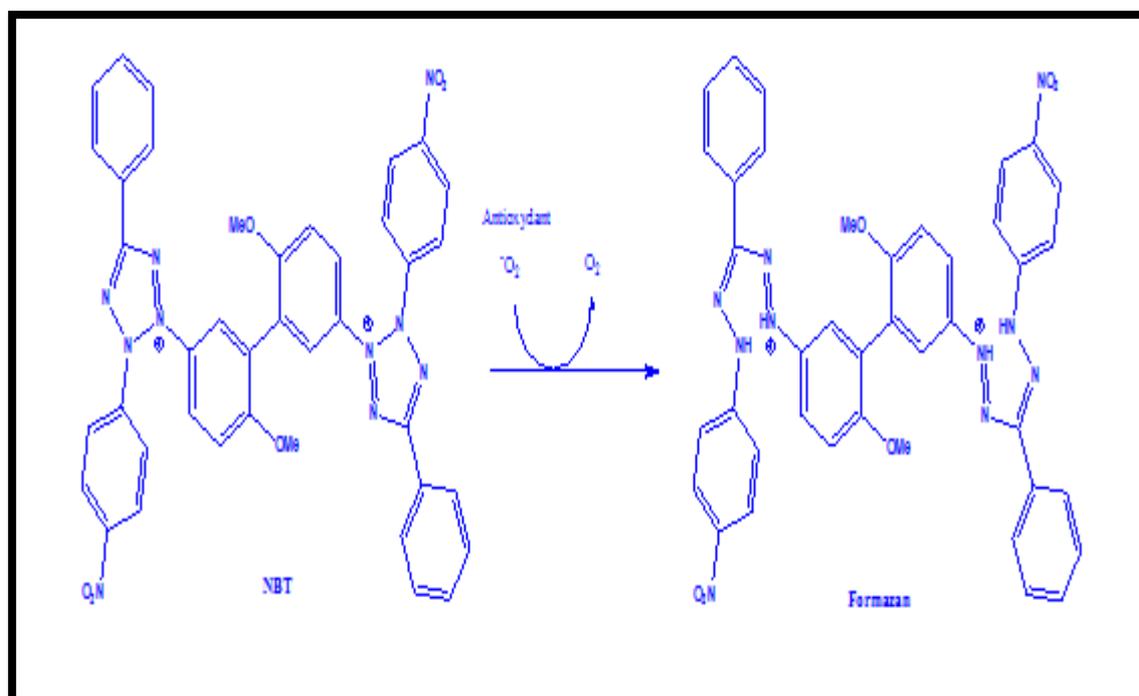
Le test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) et la formation de ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )



**Figure II.5: la formation de ferrocyanure de potassium**

### II.2.5.6. Piégeage du radical superoxyde par le DMSO alcalin :

Dans ce procédé, le radical superoxyde est engendré par l'addition d'hydroxyde de sodium à de l'air saturé de DMSO. Le superoxyde généré reste stable en solution et réduit tétrazolium nitrobleu (NBT) en colorant formazan à la température ambiante qui peut être mesurée à 560 nm.



**Figure II.6 : Piégeage du radical superoxyde par le DMSO alcalin**

### II.2.5.7. Chélation des ions de fer :

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe pour la catalase et Cu pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical  $\text{OH}^\bullet$  par la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lors de la réaction de Fenton

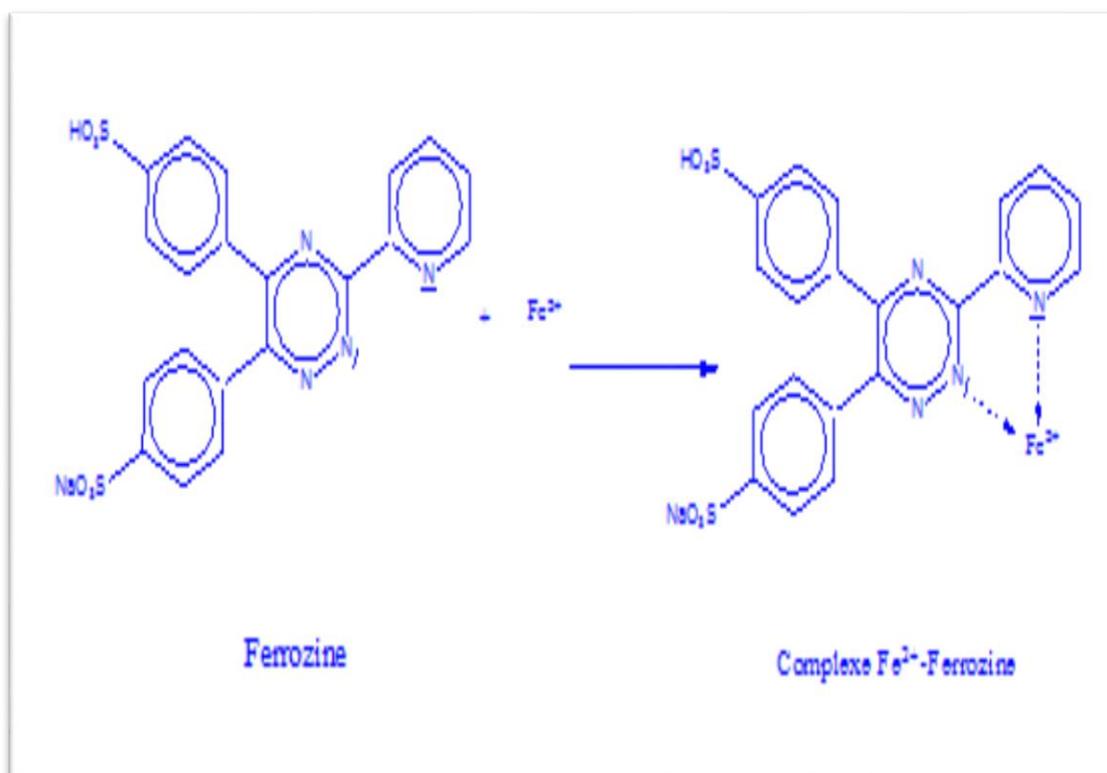


Figure II.7: Chélation des ions de fer

### II.2.5.8. Piégeage du radical hydroxyle :

Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) est un radical libre qui possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN



### II.2.5.9. Piégeage du peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule (SHRINIVAS *et al.*, 2011). Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de  $H_2O$  diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également.

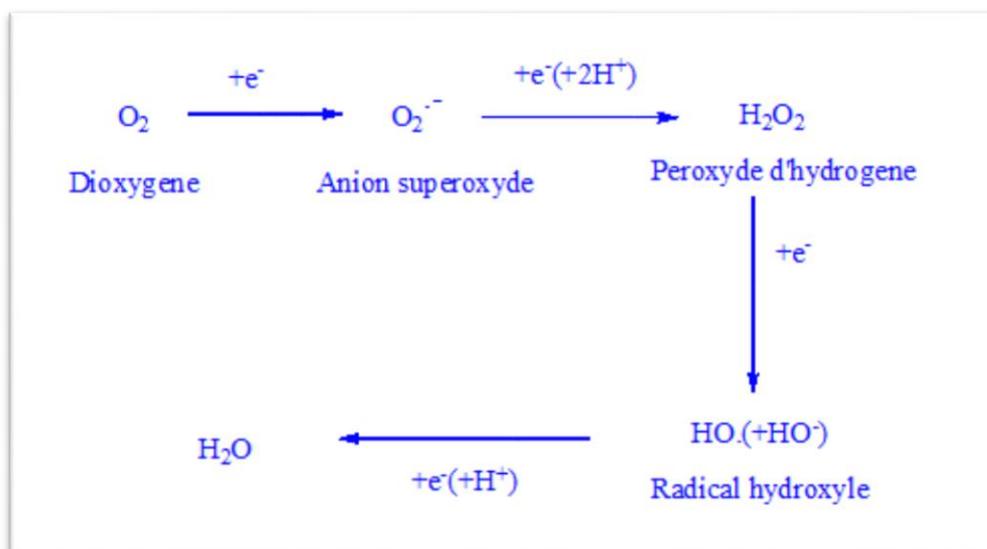


Figure II.8: Piégeage du peroxyde d'hydrogène

### II.2.5.10. Chélation des ions de fer avec la phénanthroline :

Cette technique est basée sur la formation du complexe  $Fe^{+2}$ -phénanthroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm

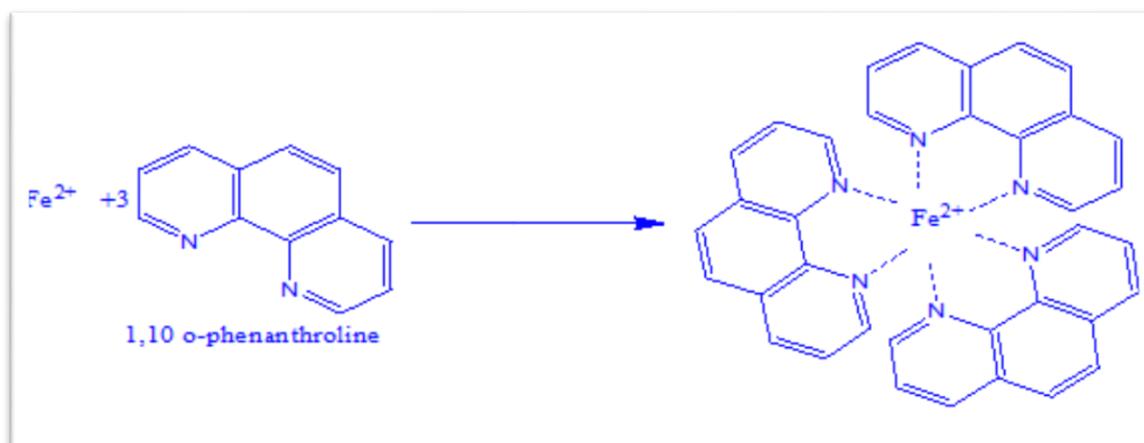


Figure II.9: la formation du complexe  $Fe^{+2}$ -phénanthroline

## Chapitre II

### Chélation du cuivre (CCA)

La capacité des molécules à piéger le  $\text{Cu}^{2+}$  suit la méthode qui utilise le violet de pyrocatechol (PV) comme agent chromogène. Dans un milieu aqueux tamponné légèrement acide (pH 6,0), les composés phénoliques peuvent se lier au  $\text{Cu}^{2+}$ , mais selon la structure chimique, la réactivité de la formation du complexe phénol- $\text{Cu}^{2+}$  est augmentée, mais il y a généralement un reste de  $\text{Cu}^{2+}$  dans le milieu réactionnel car non tout le cuivre est lié par des composés chimiques présents dans un échantillon de test. Par la suite, le  $\text{Cu}^{2+}$  restant réagit avec le pyrocatechol violet, formant un complexe de couleur sombre qui peut être suivi à la longueur d'onde 632 nm. Cependant, la couleur sombre vire au jaune en présence d'agents chélateurs dissociant le complexe, et l'activité chélatante peut ainsi être estimée par la mesure du taux de réduction de la couleur.

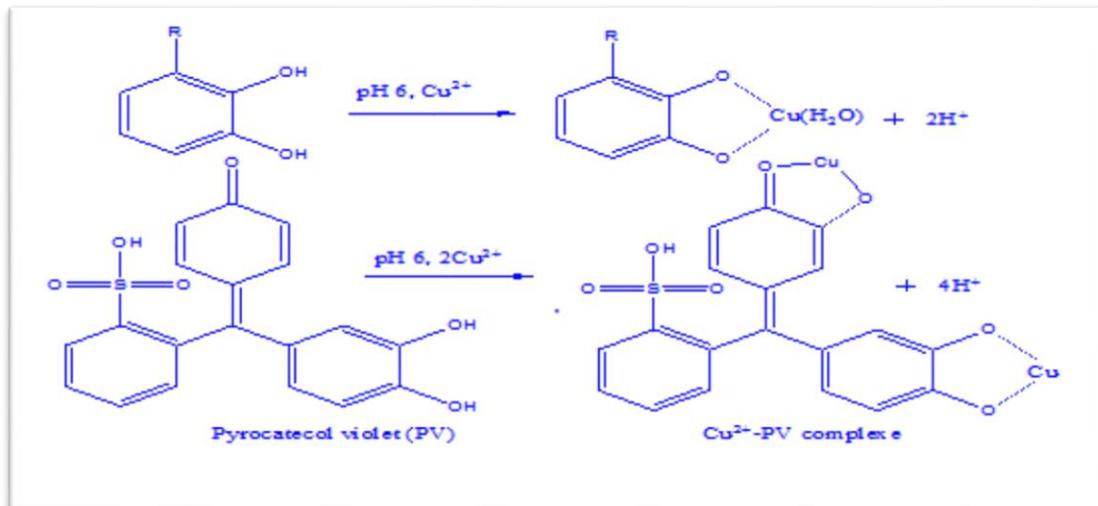


Figure II.10: Chélation du cuivre (CCA)

## Chapitre II

### II.2.5.11. Piégeage du radical superoxide (Pyrogallol)

Le principe de cette méthode repose sur la capacité de l'inhibition de l'autooxydation du Pyrogallol

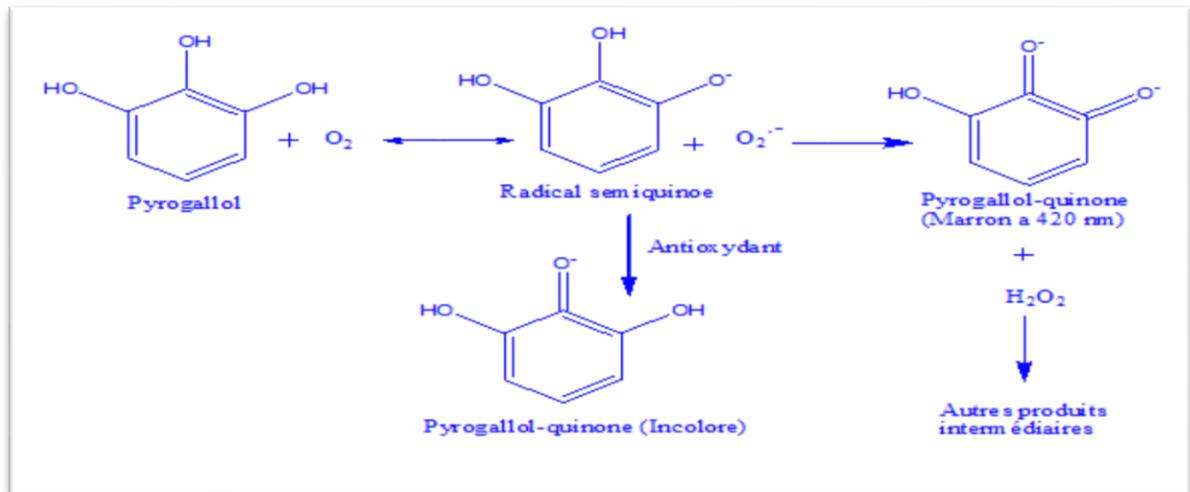


Figure II.11 : Inhibition de l'auto oxydation du Pyrogallol

### II.2.5.12. Piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

La méthode du piégeage du radical libre Galvinoxyl est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à réduire le radical stable du galvinoxyl ( $Gox^{\cdot}$ ). En effet, en présence de donneurs d'hydrogène, le radical libre  $Gox^{\cdot}$  est réduit à  $GoxH$ .

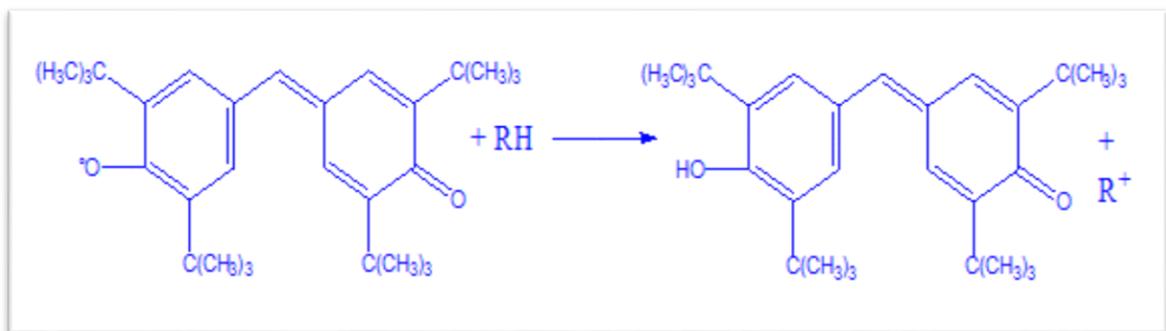


Figure II.12: Piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

### II.2.5.13. Nanoparticules d'argent (méthode SNP)

Cette méthode est basée sur la réduction des ions  $Ag^+$  par les polyphénols en présence de graines d'argent stabilisées par le citrate. La couleur de la suspension stable est contrôlée en faisant varier la concentration du citrate trisodique, de nitrate d'argent et de graines d'argent. La réduction d' $Ag^+$  en nanoparticules d'argent sphériques (SNP) par des polyphénols en

présence du citrate trisodique et de graines d'argent produit une bande d'absorption de résonance plasmonique de surface (SPR) très intense à 423 nm.

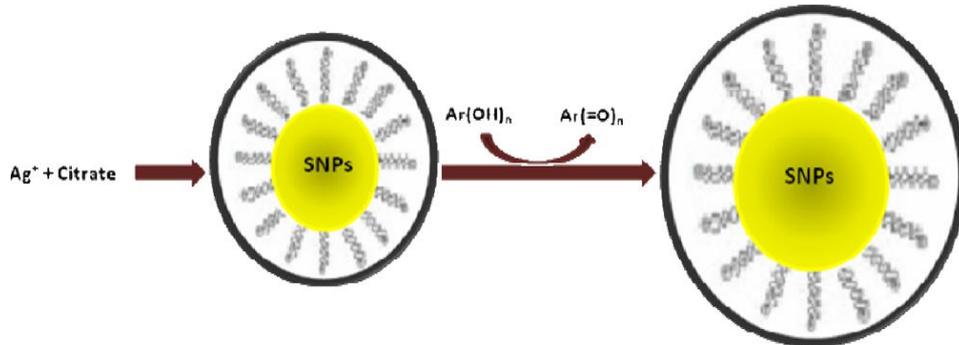


Figure II.13: la réduction des ions Ag<sup>+</sup> par les poly phénols

### II.2.5.14. Capacité d'absorbance du radical oxygène (ORAC)

Les radicaux libres sont générés par l'hydrolyse du dichlorhydrate de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) et oxydent à leur tour la fluorescéine, dont la fluorescence a été mesurée en continu à 520 nm.

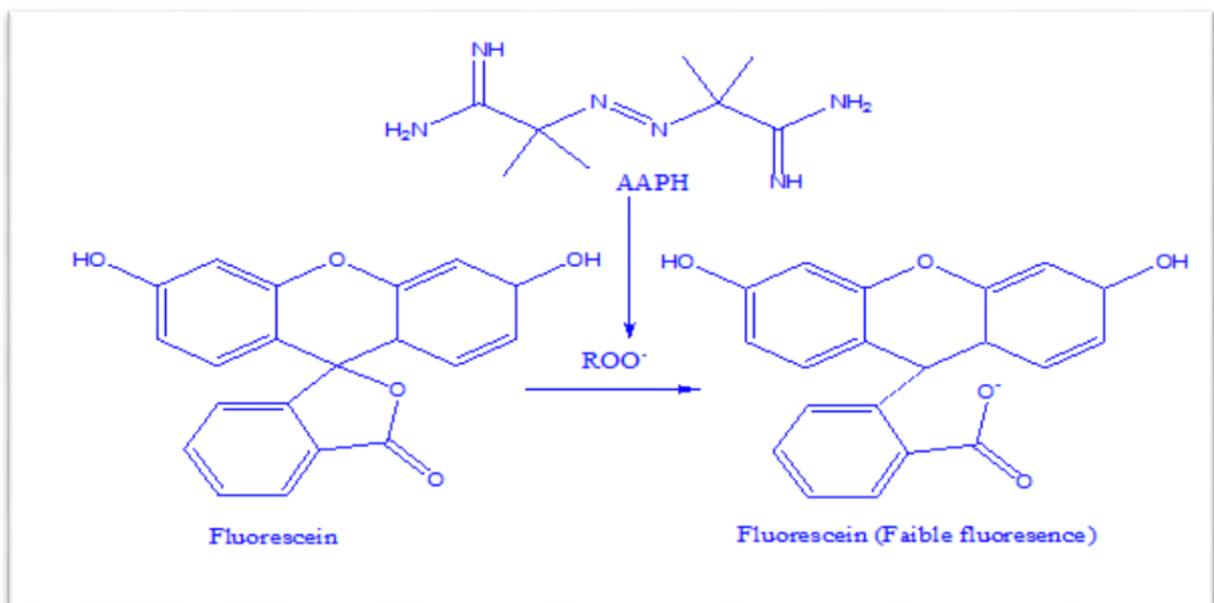


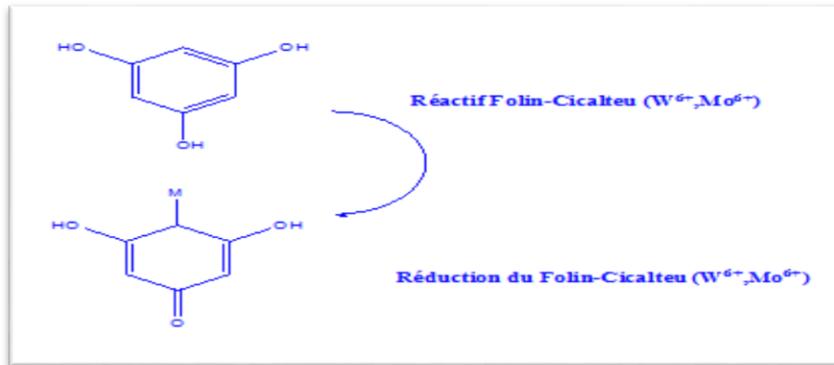
Figure II.14: Formation de la fluorescence

### II.2.5.15. Total phénolique et flavonoïde

Le contenu en polyphénols totaux des extraits est évalué suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965). Ce dernier est un réactif acide de couleur jaune

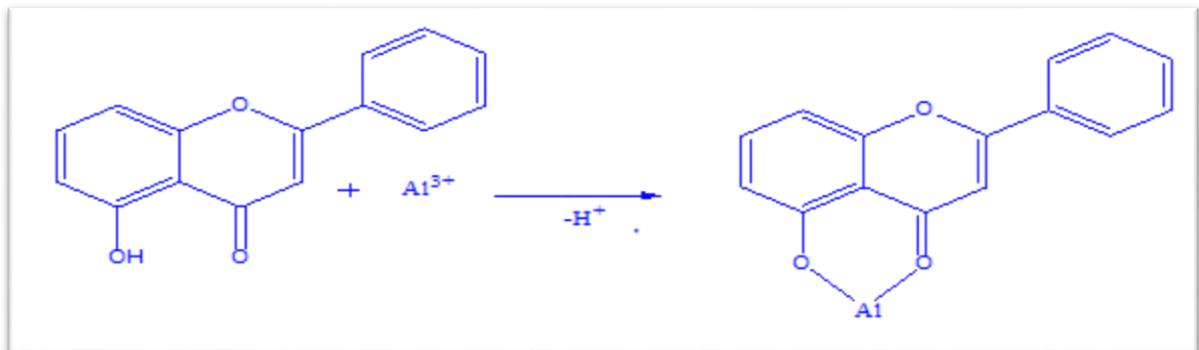
## Chapitre II

constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, en présence de polyphénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). L'absorbance du mélange obtenu est mesurée à 760 nm.



**Figure II. 15: Réduction de Folin-Ciocalteu**

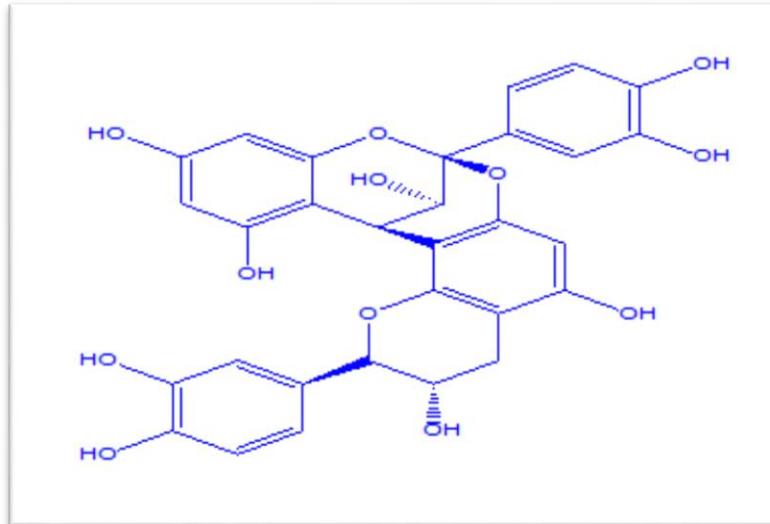
Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{3+}$  et les flavonoïdes. La méthode de **Topçu et al., (2007)** est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.



**Figure II.16: formation d'un complexe a partire d' $Al^{3+}$  et les flavonoïdes**

### II.2.5.16.Total tannins

La teneur en tanins condensés est déterminée par la méthode de vanilline décrite par (Julkunen-Titto, 1985). Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes rouges, cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline.

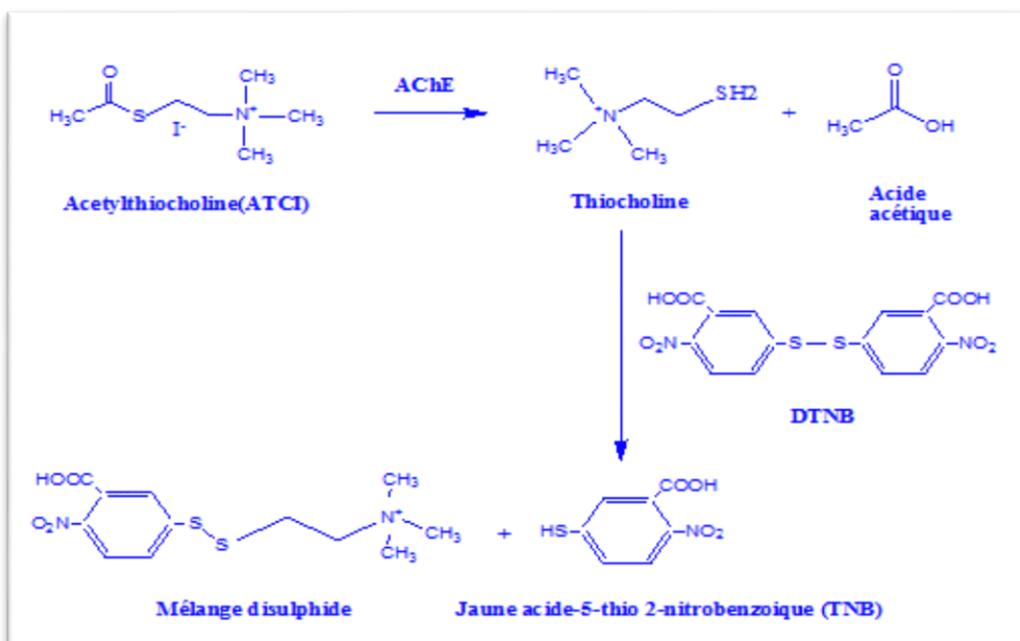


**Figure II. 17: complexes rouges**

### II.3.Activités enzymatiques :

#### II.3.1.Anti-cholinestérase (AChE, BChE)

Les inhibiteurs actuels de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) possèdent quelques effets secondaires défavorables et sont efficaces seulement contre le type doux de la maladie d'Alzheimer. En conséquence, il est très nécessaire de développer de nouvelles drogues naturelles avec des meilleurs inhibiteurs de l'AChE et du BChE afin de lutter contre cette maladie neurodégénérative.



**Figure II.18 : Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE)**

### II.3.2. Activité tyrosinase

Les mélanines qui constituent pour la peau une protection naturelle contre les effets néfastes des UV. Divers dysfonctionnements de la mélanogénèse dus à des agressions extérieures, aux perturbations hormonales ou au vieillissement se traduisent par l'apparition de taches d'hyperpigmentation qui peuvent être particulièrement inesthétiques. Dans ces cas, l'utilisation d'actifs capables de réduire la production des mélanines pourrait permettre de remédier à ces troubles de la pigmentation. La recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentant en dermocosmétique

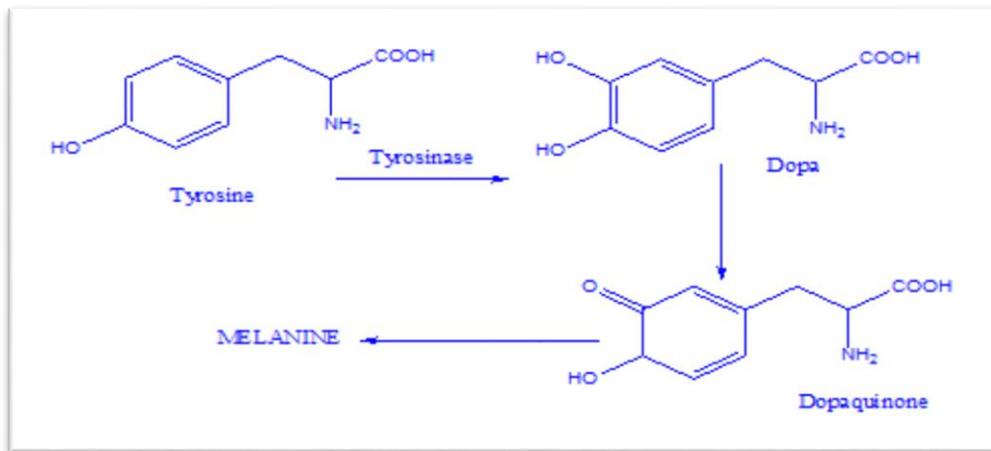


Figure II.19 : la production des mélanines

### II.3.3. Activité $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme digestive, produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques, synthétisée également dans les fruits de plantes durant leur maturation. C'est l'un des endo-amylases les plus significatives qui hydrolyse les liaisons  $\alpha(1-4)$  glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amidon pour donner des molécules de maltose (disaccharides de  $\alpha$ -glucose). Cette enzyme est principale pour l'absorption et la digestion de l'amidon et l'hydrate de carbone intégré dans la nourriture, ceci peut être une cible pour le traitement du diabète type 2.

## Chapitre II

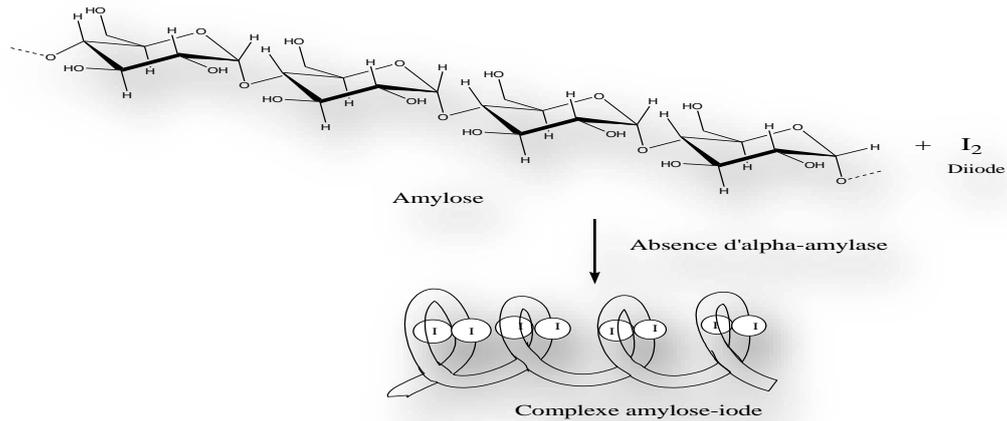


Figure II.20 : Activité  $\alpha$ -amylase

### II.3.4. Activité $\alpha$ -glucosidase

L'un des traitements thérapeutiques efficaces de la maladie consiste à réduire l'hyperglycémie postprandiale par l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, une enzyme hydrolysant les glucides pour retarder l'absorption globale du glucose. Ces dernières années, de nombreux travaux de recherche ont été menés à la recherche d'inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase (IAG) nouveaux et efficaces à partir de sources naturelles comme alternatives à l'AGI synthétique en raison de leurs effets secondaires désagréables.

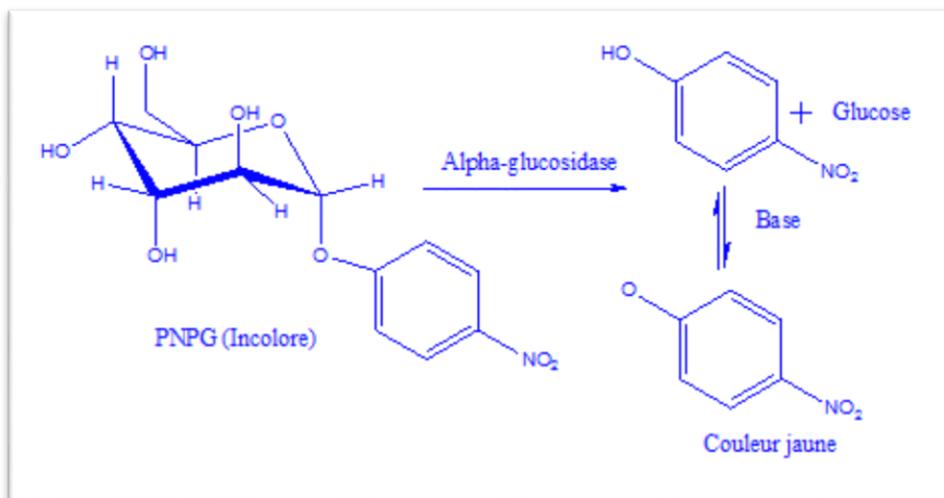


Figure II.21 : Activité  $\alpha$ -glucosidase

### I.3.5. Activité urease

L'uréase est une enzyme découverte par **J-B Sumner en 1926**. Elle joue un rôle important au sein des organismes vivants dans la décomposition d'une molécule organique, l'urée. On trouve l'uréase dans des organismes végétaux (comme le haricot sabre) mais également dans des bactéries pathogènes (telles que *Helicobacter pylori*). L'urée ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) réagit avec l'eau pour former de l'ammoniac  $\text{NH}_3$  et du dioxyde de carbone ce milieu basique favorise la croissance de la *Helicobacter pylori* qui provoque des ulcères

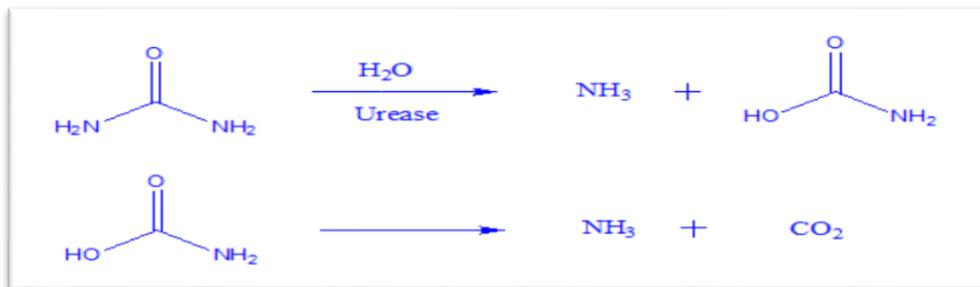


Figure II.22 : la formation de l'ammoniac

### II.3.6. Activité anti-brunissement

Oxydation et la polymérisation des composés phénoliques comme résultat de l'activité enzymatique des polyphénoloxydases (PPO) et/ou des peroxydases (POD) est qui pouvant conduire à la formation de pigments bruns.

**Mesure de l'activité anti-peroxydase :**

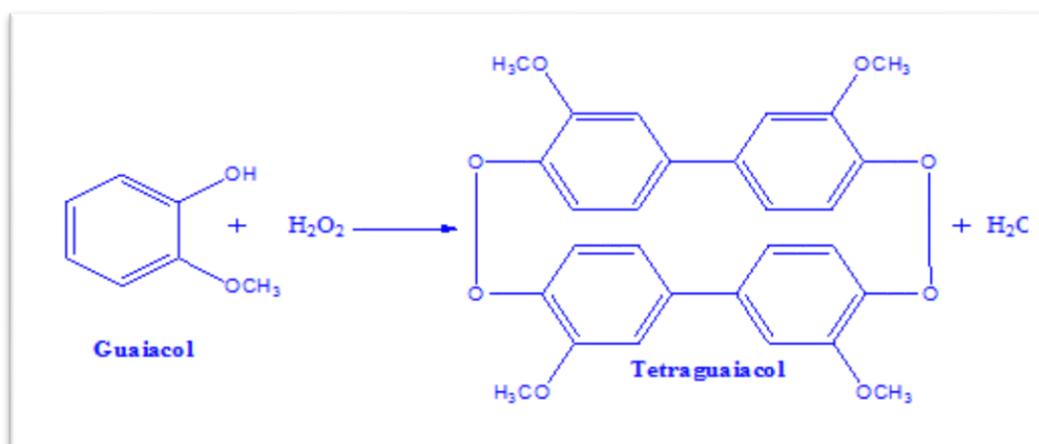


Figure II.23 : l'activité anti-peroxydase

### II.4. Autres activités:

#### II.4.1-Activité cytotoxique (Brimp shrimp)

L'essai de la toxicité sur *Artemia salina* est un test de toxicité générale facile à mettre en œuvre et largement utilisé dans l'évaluation de la toxicité générale d'extraits naturels d'origine terrestre ou marine.



Figure II.24 : Activité cytotoxique (Brimp shrimp)

#### II.4.2-Activité anti-inflammatoire

Le principe consiste à l'inhibition de la dénaturation du BSA (Albumine de sérum bovin) après son exposition à une température supérieure à 60 °C, avec la présence d'un produit candidat/anti-inflammatoire qui sert à évaluer sa capacité à bloquer la dénaturation de cette protéine (ABS).



Figure II.25 : l'inhibition de la dénaturation du BSA

#### II.4.3-Evaluation de la phytotoxicité

La phytotoxicité des composés est connue d'être impliquée dans les interactions allélopathiques inhibant la germination des graines et la croissance des plantes. Ces propriétés ont été étudiées pour le développement d'herbicides. Dans ce contexte les composés

## Chapitre II

---

phytotoxiques peuvent être considérés des outils alternatifs attrayants pour contrôler la croissance des mauvaises herbes.

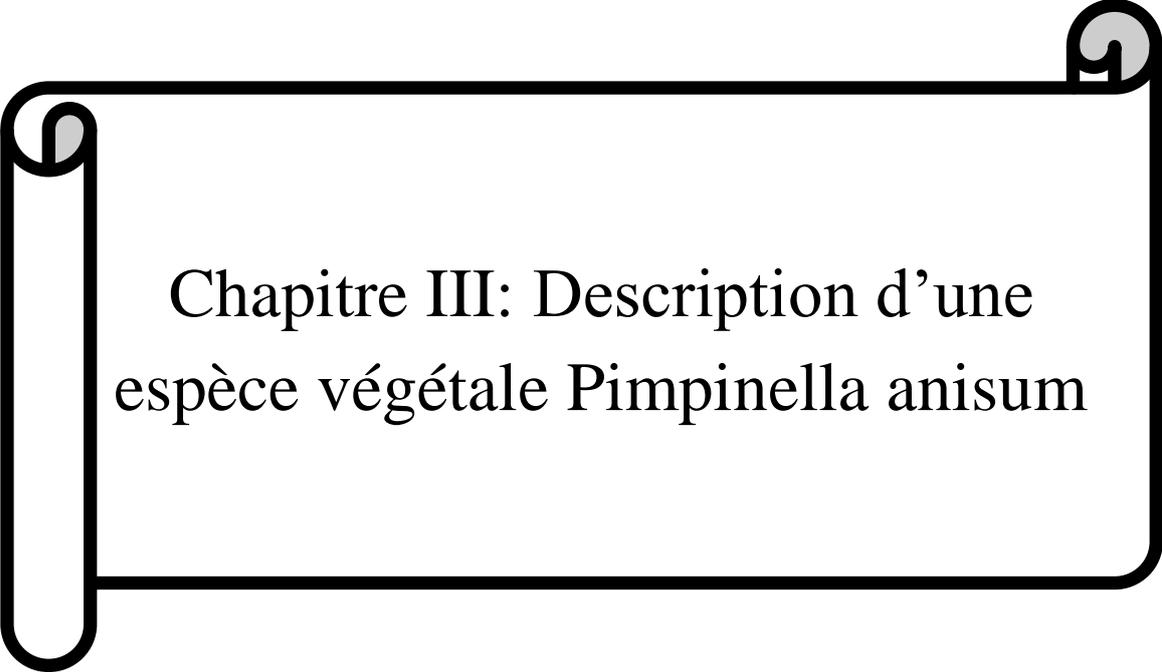
### II.4.4-Evaluation du facteur de protection solaire (SPF)

L'absorbance est mesurée dans l'intervalle de 290 à 320 nm chaque 5 nm (UV-B), et la valeur du SPF est calculée par l'application de l'équation mathématique de **Mansur (1986)**

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

### II.5.Conclusion :

Les activités biologiques sont pour but de déterminer l'efficacité et l'utilité bénéfique des huiles extraites par des plantes pour renforcer le concept de la chimie verte et remplacer la synthèse chimique qui était dans un temps dangereuse avec un impact nocif par un procédé vert plus efficace et moins nocif.



Chapitre III: Description d'une  
espèce végétale *Pimpinella anisum*

## Chapitre III

---

### III.1.introduction :

L'anis est classifié parmi les plantes qui ont été cultivé pendant l'antiquité aussi au moyen d'âge [30], la plante universellement appréciée, son histoire semble cohérence avec celle de l'homme. Dans ce chapitre on va voir une description sur l'anis vert

### III.2.Historique :

L'anis compte 150 espèces à travers l'Europe et Afrique, il a son origine dans la partie orientale du bassin méditerranéen, moyen orient; et en Egypte est trouve Just dans certaines îles de la mer Egée, sa culture fut introduire en toscane par les romaines au moyen Egée.

L'anis est cultivée en France méridionale, en Espagne en Italie, à malte en Turquie, en Russie méridionale et Gans le nord de l'Inde. [31]

Cette plante a connu une large utilisation par de nombreuses civilisations dans le cadre des remèdes traditionnels dont on peut citer les Egyptiens , les Perses et les Indous , ainsi que les Romains avaient l'utiliser dans le dessert pour faciliter la digestion et il a coupé une place de choix dans la matière médicale chez les Grecs en suite chez les Romains .[32] .Il fort employé par les Egyptiens a servait d'épice, de plante médicinale, de plante alimentaire et aussi dans un but exclusivement thérapeutique, notamment pour soigner des cardiopathies.[33]

L'origine de cette plante est mal connue, cependant pour, Elle reste mystérieuse dont ils constataient que l'anis vert est apporté par les anciens d'Asie. D'autre part ces graines viennent de Syrie et ne fait introduire en Europe que vers le milieu de XVI<sup>e</sup> siècle où elles étaient utilisées pour aromatiser le pain.

Bien que les avis des auteurs fussent différents sur l'origine d'anis vert, cependant tous s'accordaient que cette plante est l'une des plus anciennes herbes médicinales du monde.

Un arrêt du Parlement l'exclusivité de la composition et de la vente des eaux d'anis et de cannelle, mais autorise les apothicaires à en fabriquer et à en débiter en remède seulement Comme les autres « épices ».

L'anis donne lieu des siècles durant à un commerce d'autant plus actif qu'on l'emploie autant et même plus comme assaisonnement, en boisson et en parfumerie que comme médicament. Consacré sous diverses formes par la pharmacopée.

## Chapitre III

---

Au XX<sup>e</sup> siècle, il y avait une grande popularité pour les boissons anisées et comme elles prenaient le chemin de l'ombre, ils doivent être à l'utilisation des réglementations strictes pour assurer l'extracteur de la promotion.

Associée à l'anis tout au long de son histoire, la réglisse faisait déjà partie du droguier des Assyriens et, toujours en faveur chez les confiseurs, elle a vu son intérêt thérapeutique bien établi par les médecins. [34]

### III.3. Description botanique de l'anis vert :

La confusion autour de cette plante est toujours présente vu la similarité à divers degrés de saveur entre les graines d'anis vert et les graines de fenouil (parfois appelé anis doux), l'aneth, le carvi et le cumin (faux anis). Cependant le vrai anis est nommé scientifiquement *Pimpinella anisum* L. tandis que les autres épices citées précédemment appartiennent à la même famille: les Ombellifères mais à des espèces différentes.

La graine d'anis est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Apiées, nommée botaniquement *Pimpinella anisum*, connue sous le nom de Yansoon dans la plupart des pays arabes ; et a des noms communs dans différents pays tels que:

**Anis vert** (France); **Graine d'anis** (Japon); **Anis et anis étoilé** (USA); **Annesella** (Italie); **Anisa, Badian, Kuppi, Muhuri, Saunf et Sop** (Inde); **Boucage anis, Petit anis** (Afrique du Nord), **Et Anise** (Angleterre), dialecte locale: **Habat El Halawa** .

Ainsi ***Pimpinella anisum* L** tire son nom du mot latin **Anisum** signifiant d'abord une plante à odeur très agréable [34]; sa saveur est sucrée; et Le transe-anéthol est principalement responsable du goût et de l'odeur distinctifs des graines d'anis. Cette plante appartient à la même famille de carotte dont elle est classée comme suit [35]:

1. Règne : Végétal
2. Division : Spermatophyte
3. Subdivision : Angiosperme
4. Classe : Magnoliopida
5. Sub-classe : Rosidae
6. Ordre : Apiale
7. Famille : Apiécée (ombellifères).
8. Genre : *Pimpinella* Activer

## Chapitre III

Actuellement, il est cultivé dans les climats plus chauds [36]. Toutes les parties de la plante de l'anis vert sont aromatiques : feuilles, tiges, fruits, fleurs, racines et On peut résumer la plante par suivant : **figure-1**

- **Racine** : fuselée
- **La tige** : Ces tiges sont grêles, creuses et très ramifiées peuvent atteindre de 50 à 70 cm d'hauteur.
- **Les feuilles** : sont de couleur vert vif, celle de base sont larges de forme arrondie ou lobée tandis que les feuilles vers le sommet sont découpées en lanières.
- **Fleurs** : fleurs blanches petites sont groupées en ombelles [37]. floraison à lieu en juillet et août.
- **d. Les fruits** : Des fleurs blanchâtres disposées en ombelles apparaissent en été, donnant des fruits qui sont représentés par des graines d'environ 0,5 cm. Elles sont ovales, pédiculées, allongées et de couleur jaune-brun à vert-brun à stries claires. Gris verdâtre, oblongs et très parfumés [38]
- **Plante** : est recouverte de poils fins, et annuels de pollinisation croisée



**Figure III.1-** l'anis vert (fleur, feuille, fruit)

### **II.4. l'Habitat de l'anis vert :**

On résume que l'anis est originaire du bassin méditerranéen et de l'Asie Mineure. Aujourd'hui, il est surtout cultivé dans le sud de l'Europe, dans les régions méditerranéennes, au Proche-Orient, en Inde et sur le territoire de l'ancienne Union Soviétique. Il est rare que l'anis pousse à l'état sauvage. [39]

## Chapitre III

---

### II.5. Cultivé et récolte de l'anis vert :

Préfère les sols légers et sains, et les expositions chaudes et ensoleillées.

Semis au printemps, en avril-mai

La récolte des feuilles peut débuter quelques mois après le semis. Les graines se récoltent à l'automne à la maturité (septembre). [40]

Seuls ses fruits sont utilisés, c'est-à-dire ses graines, qui sont récoltés après la floraison, en juillet et en août et en automne.

Pour obtenir des graines riches en huile essentielle, il est important d'attendre leur pleine maturité avant de les récolter.

Après séchage, elles sont conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité pour ne pas perdre leurs propriétés. [41]

#### ➤ Mode de semis :

- Semer entre 15°C et 20°C dans un terreau de semis propre
- Recouvrir très légèrement les graines
- Maintenir humide mais non détrempé
- Durée de germination : Environ 10 jours. [42]



**Figure III.2 : mode de semis de l'anis vert**

### II.6. Rendement 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 [44].

## Chapitre III

---

Les graines de *pimpinella anisum* contiennent à l'intervalle suivant [43] :

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

### III.7.Composition biochimique de la graine d'anis vert :

Les fruits de cette plante sont des petites graines composées de :

- Eau (9%)
- Glucides de l'ordre de 50 %
- Protéines (18%)
- Polysaccharides (35%)
- phénoliques
- Lipides (8 – 16%) [43]
- Fibres brutes (15%)
- Cendre (7%)
- Polysaccharides, flavonoïdes, hétérosides de flavon
- Furcoumarins et hydrox-coumarines
- Ions essentiels (Potassium, calcium, phosphate et fer)
- Rendement d'huile essentielle qui représente peut varier de 1,5 à 6 % [45].

#### III.7.1.Lipids:

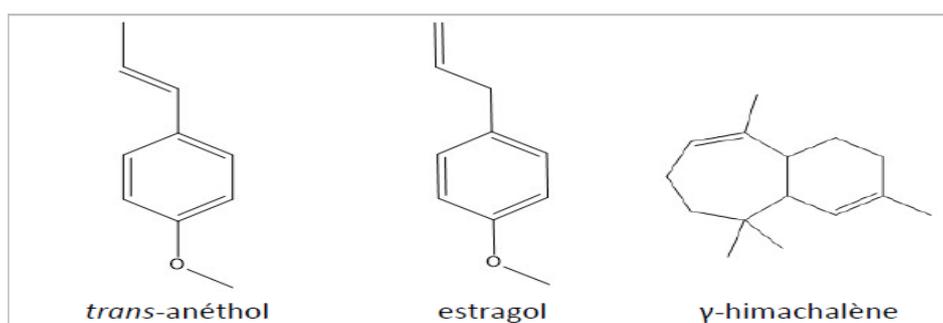
Les graines d'anis vert contiennent 8 à 16 % (23,9 % d'huile contenant des acides gras saturés et insaturés [46]. Le pourcentage des acides gras insaturés est nettement supérieur à celui des acides gras saturés.

L'acide pétroselinique est l'acide gras le plus important avec une contribution allant de 50 à 70 % de la composition totale en acides gras.

D'autres acides gras sont également présents tels que l'acide oléique avec une contribution de 22 à 28 %, l'acide linoléique de 5 à 21 % et l'acide palmitique de 5 à 10 %. (16 et 17) autres acides gras.

### III.7.2. Huile essentielle :

De nombreux travaux sur *Pimpinella anisum* L. ont révélé que le constituant majoritaire de son huile essentielle est le *trans*-anéthol et que le  $\gamma$ -hima-halène et l'estragon y sont également présents mais dans des proportions moindres. [48], [47]. **Figure III.3**



**Figure III.3 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de *Pimpinella anisum* L.**

Le *p*-anis aldéhyde, l'eugénol, le  $\alpha$ -caryophyllène sont des exemples de composés mineurs contenus dans l'huile essentielle de la graine d'anis vert. [49]

Les résultats repris dans le **Tableau 1** illustrent la variation de la composition de cette huile essentielle en fonction de la provenance de la plante.

**Tableau III.1: Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de *Pimpinella anisum* L. en fonction de leurs provenances**

	Maroc [50]	Inde [51]	Turquie [52]
<i>trans</i> -anethol	81,19	90,1	93,9
$\gamma$ -himachalene	6,22	-	-
( <i>Z</i> )-anethol	0,95	-	-
Estragole	0,46	2,3	2,4
<i>p</i> -anisaldehyde	-	-	-

### III.7.3. Composés phénoliques :

Attribuent aux graines d'anis vert une teneur en composés phénoliques Totaux de  $3,539 \pm 0,016$  mg équivalent acide gallique/g [53]. Au niveau de la composition, la graine d'anis vert contient différents flavonoïdes glycosylés tels que la quercitrine-3-glucuronide, le rutoside, la lutéoline-7-glucoside, l'isoorientine, l'isovitexine, l'apigénine-7-glucoside. [54][55]

### III.8. Composition nutritionnelle de l'anis et constituants chimiques :

L'anéthol, qui est utilisé dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire, de la parfumerie et des arômes, est le constituant le plus important de l'anis.

Le rendement et la teneur en anéthol de l'anis sont affectés par le génotype, les conditions écologiques, et en particulier par les pratiques agricoles telles que l'irrigation, la population végétale, l'engrais et la date de plantation.

En dehors de l'anéthol, l'anis est bien connu pour son huile essentielle, ce qui lui confère la caractéristique odeur et arôme.

Bien que le principal composant de l'huile d'anis soit le tran-anéthol (75 à 90%), les autres constituants comprennent les coumarines (**ombelliféracée, umbelliprénine, bergaptène et scopolétine**), les lipides (**acides gras, bêtaamyryne, Stigmastérol et ses sels**), des flavonoïdes (**flavonol, flavone, glycosides, rutine, isoorientine, et isovitexine**), des protéines et des glucides. [53]

### III.9. Etude photochimique de *Pimpinella anisum* L:

Les graines de l'anis vert ont été investiguées pour leur composition photochimique, ainsi les résultats ont révélé à travers plusieurs études, la présence des principaux composés bioactifs: poly phénols, flavonoïdes et tanins

Une étude sur la composition des graines entières d'anis vert a démontré que le composé majoritaire le **Tran-anéthol** est présent à un pourcentage de 57,4% dans les graines et à 75,2% dans l'huile essentielle.

Ainsi, L'huile essentielle de ***Pimpinella anisum* L** est composée de divers constituants qui sont mentionnés dans **le tableau 2:**

## Chapitre III

**Tableau III.2: Composition chimique de l'huile essentielle des graines d'anis vert [60]**

Composé	Pourcentage (%)	
Alcool anisique	0,2 – 0.4	Hydrocarbures terpéniques
B-bisabolène	1,3	
a- zingibérène	1,5	
6-hémachalène	9.9	
B- caryophyllée	8-23,7	
Méthyle- clavicule (estragon)	0,1 - 5	Phénols
(z) – anéthol	0,2-1,1	
(E) – anéthol	75,2-96,1	
Linalol	0-2.2	Alcools
Alcool animique	0.2-0.4	
Anis aldéhyde Phényle	0.5-2,5	Aldéhyde
Aldéhyde	1	Ester

### III.10. Usage d'anis vert :

L'anis est une plante aromatique connue et employée depuis l'antiquité par de nombreuses populations pour ses vertus, son goût et son saveur agréable. Les graines ont été utilisées comme un condiment. Cependant le fruit de cette plante était largement employé dans la confection de boissons alcooliques traditionnelles dans certains pays : France, Inde et Turquie. En outre, au moyen âge il a été utilisé comme un aphrodisiaque. D'après la littérature, les graines d'anis possèdent une large utilisation par rapport aux autres parties de la plante mais ça n'empêche pas que les feuilles peuvent être employées pour préparer les assaisonnements, le thé et rentrent dans la garniture des plats cuisiniers. En dehors d'utilisation culinaire, l'anis était exploité depuis longtemps dans le cadre de la médecine traditionnelle par les anciennes civilisations dont on trouve que les Égyptiens avaient l'utiliser pour lutter contre les insectes et les parasites. [61]

#### III.10.1. Usage culinaire :

Graines d'anis vert, à usage culinaire.

- Les feuilles fraîches finement hachées servent à aromatiser certains plats : crudités, salades, potages, etc.

## Chapitre III

---

- Les graines sont utilisées en pâtisserie et en confiserie ( pain d'épices, dragées, etc.).
- Elles entrent également dans la composition de liqueurs et boissons anisées (anisette, raki, ouzo, pastis, Pontarlier, absinthe, etc.). Ces boissons doivent leur goût aux terpènes contenus dans la plante.

### **III.10.2.L'utilisation en médecine thérapeutique :**

Le fruit de *Pimpinella anisum* est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies. Populairement, dans la région du Moyen-Orient, en particulier par temps froid, les graines d'anis sont consommées sous forme de boissons chaudes similaires au thé, car son effet positif contre le froid, la toux, la bronchite, la fièvre, les coliques, l'inflammation de la bouche et de la gorge, les problèmes digestifs et la perte d'appétit. Il est utilisé comme anticonvulsivant, un ingrédient dans la médecine de la toux, antiseptique, antispasmodique, expectorant, diaphorétique Un stimulant immunitaire, promoteur de croissance, antifongique, antibactérien .Effet relaxant, anti cholinergique Stomachique, stimulant, diurétique. Digestion assistée, apéritif, diurétique, tranquillisant Augmenter la sécrétion de lait, encourager les menstruations, faciliter la naissance, augmenter la libido. Fièvre, problèmes digestifs l'aérocolie et les renvois, idéale pour les coliques et reflux des bébés. .L'anéthol est utilisé dans la synthèse de substances pharmaceutiques telles que le chloral, un agent anticonvulsivant et le phénobarbital. [62]

### **III.10.3. Usage compagnonnage**

Éloigne les pucerons, les vers ou chenilles.

### **III.10.4. 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 [61].

Etude photochimique hplc humidite

### **III.11. les méthodes d'extraire l'huile de l'anis vert :**

Plusieurs études avaient décrit différentes méthodes d'extraction de la graine d'anis telles que :

- La distillation à la vapeur.
- Hydro distillation.
- Extraction de fluide supercritique à l'aide de dioxyde de carbone

## Chapitre III

---

- Extraction de solvant avec de l'éthanol, du méthanol, de l'eau Éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, acétone et hexane. [57]

### III.12. Activités Biologiques de *Pimpinella anisum* L:

En plus de ces propriétés carminatives, expectorantes et anti-colique, l'huile essentielle des graines d'anis vert possède d'autres activités qui ont été étudiées par de nombreux chercheurs; dont on distingue :

#### III.12.1. Activité parasiticide et insecticide :

Les composés actifs de l'H.E des graines d'anis vert tel que : l'anéthol, anisaldéhyde et myristicin possèdent une légère activité contre les insectes, les parasites et les acariens dont les anciens avaient l'utilisé comme un traitement pour lutter contre la gale et les poux. Cependant l'H.E de *Pimpinella anisum* L semble avoir une activité **larvicide** et **ovicide** dont elle a montré une toxicité au 4<sup>ème</sup> stade de développement avec une DL50 de 115  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En outre elle possédait une forte activité nématocide contre **M.incognita**.

#### III.12.2 Activité antifongique:

L'H.E des graines d'anis vert possède une activité antifongique importante dont elle est considérée comme un puissant inhibiteur contre **Penicillium sp** et **Aspergillus sp** avec une concentration inhibitrice minimale (CMI) de 40  $\mu\text{l}$  ml et contre **P.chvsogenum** a 60  $\mu\text{l}$  ml. Cependant le principal constituant de cette huile qui est l'anéthol semble être efficace avec contre les levures particulièrement contre **Saccharomyces cerevisiae** avec une concentration fongicide minimale (MFC) de 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ . [58]

### III.13.. Activité antibactérienne :

Il a été démontré que l'H.E d'anis est active contre plusieurs bactéries, dont elle inhibe la croissance de nombreuses espèces y compris **Staphylococcus aureus**, **E.coli**, **Bacillus subtilis** et **Pseudomonas aeruginosa**.

**III.13.1. Activité antiulcéreuse :** La suspension aqueuse des graines d'anis vert possède une activité cytoprotective et anti ulcéreuse contre l'ulcère gastrique provoqué expérimentalement chez les rats, ainsi ont montrés que cette suspension réduit significativement la sécrétion gastrique et l'acidité, de plus elle inhibe complètement les ulcérations chez les rats. Cet effet produire probablement par la médiation des prostaglandines due à l'H.E d'anis vert.

### III.13.2. Activité antioxydant :

Certaines études établis suggèrent que l'H.E d'anis vert peut agir comme un antioxydant, ainsi les études de sur l'ulcère gastrique chez le rat étaient suivis par celle de qui ont conclu que l'effet anti ulcéreux d'H.E d'anis était du probablement à ses propriétés antioxydants.

D'autre par ont trouvés une forte corrélation entre le potentiel antioxydant et les fractions flavonoïdes qui représentent l'un des composés actifs de cette huile Essentielle. [62]

### III.14. L'effet bénéfique de *Pimpinella anisum* L sur le système nerveux :

Dans la littérature on trouve que la famille des Apiécée renferme 08 genres et 08 espèces qui sont utilisés pour traiter les désordres neurologiques. Parmi elles, *Pimpinella anisum* L, qui est connue depuis les nuits des temps par ses vertus thérapeutiques, ainsi les extraits de cette espèce restent utiliser aujourd'hui où ils rentrent comme un ingrédient dans la production des médicaments de toux, de stress et les tranquillisants.

Cette utilisation rentre le plus souvent dans le cadre de la médecine traditionnelle qui a été très évoluée chez les Arabes et les Perses. En effet, la plante d'anis vert a été largement exploitée depuis plusieurs siècles notamment comme un remède pour traiter les convulsions et l'épilepsie dans la médecine persienne traditionnelle, en plus elle possédait un effet **neuroprotecteur** contre les maladies **cérébro-vasculaires**.

Le mécanisme d'action de cette plante sur le système nerveux reste encore mal connu, mais à travers l'ensemble des études établis sur ce sujet, ont constaté que l'effet anti convulsant de l'extrait et d'H.E d'anis vert pourrait être dû à l'activation des récepteurs **GABAergique**.

En addition, de nombreuses études in vivo, ont démontré que l'extrait et l'H.E de *Pimpinella anisum* L, possédaient un potentiel d'action sur le système nerveux dont ils retardent (mais ne protègent pas) les crises induites par le **picrotoxin** (PTX) chez les rats.

D'une part, suggéraient que l'H.E des graines d'anis peut agir sur le système nerveux par l'augmentation de seuil de convulsion et par l'inhibition de sa propagation. D'autres travaux de cette même équipe ont trouvé que l'H.E peut aussi inhiber les convulsions induites chez le rat suite à une administration d'une dose élevée de **pentylenetetrazole** (PTZ) ou suite à un choc électrique.

D'autre part, trouvé que l'H.E de *Pimpinella anisum* L pourrait avoir une influence sur l'activité bioélectrique des neurones dans des conditions de contrôles (chez l'escargot) ou bien

## Chapitre III

---

après l'induction d'une crise épileptique par PTZ. Tous les composés d'anis vert pourraient être responsables de l'effet **neuroprotecteur** exercé par l'H.E sur le système nerveux. En effet, le transe-anéthol-le composé majoritaire- est largement utilisé comme un substrat pour la synthèse d'une variété de substances d'intérêt **neuropharmaceutique** tel que les médicaments sédatifs et les anti convulsant. Exemple : l'anéthol est le substrat de la synthèse du Phénobarbital, qui est un médicament potentiellement anti convulsant. [63]

### III.15. Toxicité de *Pimpinella anisum* L:

Selon la classification des produits toxiques, les substances avec une Dose létale 50 (DL50) entre 1 et 5 g/kg sont considérées comme faiblement toxiques, ainsi les composés avec une valeur de DL50 supérieure à 5 g/Kg sont pratiquement considérées comme non toxiques . Cependant a bien démontré l'absence de mortalité après une administration de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L à des doses de : 0,5, 2,8, 16 et 32 g/kg par voie orale. Ainsi la DL50 par voie **intrapéritonéale** de l'extrait aqueux et **éthanolique** de l'anis vert est de 4,93 g/kg et 3,77 g/kg respectivement.

Ils constaté que cette plante n'a aucun effet toxique lorsqu'elle a été administrée à des doses 10 fois plus grandes que celles connue chez l'homme. En outre, ont trouvé que la DL50 de l'huile essentielle des graines d'anis vert obtenue par Hydrodistillation est de 0,847 ml/kg testée chez les souris albinos, ainsi la DL50 de l'huile fixe de cette même plante est de 3,152 ml/Kg. La voie d'administration et l'espèce animale peuvent influencer le seuil de toxicité de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* L dont la DL50 par voie orale est de 2,3g/kg chez les rats et par voie cutanée est de 5g/kg chez les lapins

Le **Trans anéthole**, le composé majoritaire des graines d'anis vert, possède une DL50 de 2,1-3,2 g/kg par voie orale, et de 0,64-1.41 g/kg par voie **intrapéritonéale** chez le rat. Aucun problème n'a été enregistré lors de la prise des graines d'anis vert pendant la gestation et la lactation. Cependant., l'inhalation de la poudre de ces graines une certaine allergie chez le sujet asthmatique avec un test de peau positive ainsi qu'un patient a présenté un taux élevé des IgE anti anise dans le sang.

A forte dose l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* L., peut induire des nausées, des vomissements, des convulsions, œdèmes pulmonaires et elle peut entraîner l'ivresse, la paralysie et même un coma profond. Cette toxicité est attribuée aux : cis **anéthole** et

## Chapitre III

---

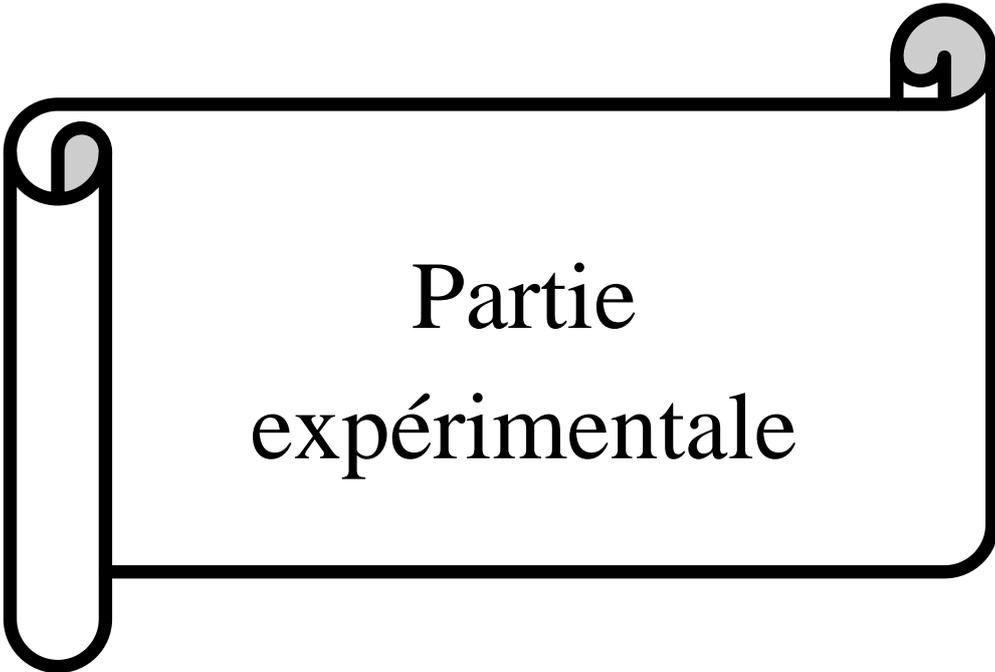
**Estragole** qui sont similaires dans leurs structures avec le **Safrole** qui est un gent fortement hépatotoxique. [64]

### **III.16. Conclusion :**

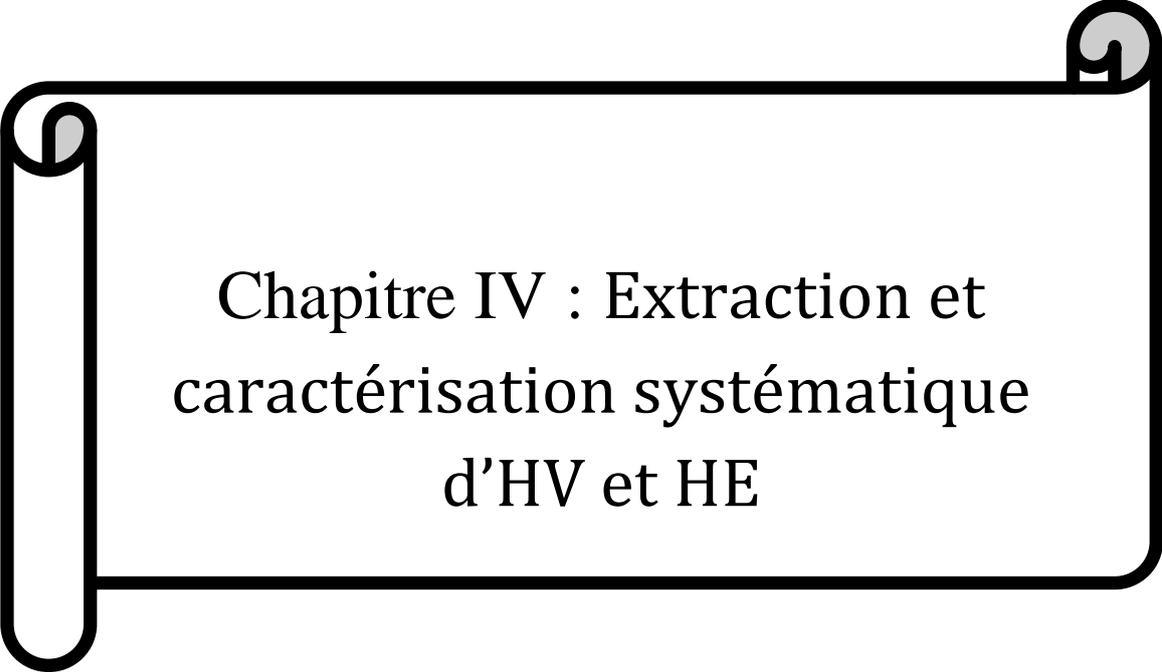
Les plantes aromatique telles que les grains d'anis vert ont une utilisation traditionnelle ou bien médicinale.

Parmi les composition chimique de l'anis vert, L'anéthol c'est le composé qui responsable sur le saveur douce et aromatique.

Les études récents ont monté que Les huile essentielle d'anis vert ont des activités antioxydants, antibactériennes ; anti-inflammatoire;... et des bonifies sur la santé.



Partie  
expérimentale



Chapitre IV : Extraction et  
caractérisation systématique  
d'HV et HE

## Chapitre IV

---

### IV.1. Introduction :

Presque tous les pays du monde sont intéressés par l'étude des plantes médicinales sur le fait que le coté végétal constitue une source importante et indispensable des médicaments, connaît actuellement un grand progrès dans le monde.

Une grande partie de la population du monde recourt largement à la médecine traditionnelle. Souvent, les gens n'ont pas d'autres choix compte tenu du prix élevé des médicaments, ils préfèrent recourir à la tradition qui est moins couteux pour être soigné.

En Afrique, les plantes trouvent une place de choix dans la thérapeutique après la vague des médicaments minéraux et d'antibiothérapie.

Malheureusement, les extraits des plantes sont souvent utilisés sans qu'ils aient été définis de manière rationnelle les principes actifs et leur mode d'action.

Dans ce travaille on décrire les méthodes d'extraction des huiles végétale et essentielle et calculer leur rendement et on décrire les propriétés physique et chimique de l'huile végétale de la plante médicinale anis vert.

### IV.2. Matériel végétal :

La matière végétale sélectionnée dans cette étude est d'espèce appartenant à la famille Apièce. Dans le monde entier, cette espèce végétale est répertoriée comme l'une des plantes les plus couramment utilisées comme source d'épices et d'extraits à valeur médicinale.

Les graines de *Pimpinella Anisium* qui utilise dans ce travaille ont été achetées chez un herboriste sous forme séché, de la province de Constantine qu'on récoltait de terre algérienne, il a une fraiche et forte odeur, et il est conserve dans des sacs propres pour une utilisation future dans l'extraction d'huile essentielles et d'huiles végétales. **Figure VI.1**



**Figure VI.1** : Anis vert utilise

Notre épice est décrite par le **tableau VI**.

**Tableau VI.1** : systématiques de l'anise vert

Type d'échantillon	Graine
Etat	Sèche
Forme	Ovale
Colleur	vert-brun
Odeur	Forte et fraiche agréable
Lieu d'achat	Herberie en Constantine
Date de l'achat	20 Avril 2021
La quantité	200g
Age	7 mois
Origine	Algérie

### IV.3. 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 (7.52g Pimpinella anisum) à sécher dans un dessiccateur **Figure IV.2** réglé automatiquement à 105°C. Le taux d'humidité Il est prendre un temps de 5 min pour affiche une valeur en pourcentage estimé à : **6.67%**.



**Figure IV.2 : dessiccateur**

### IV.4. Choix de la méthode d'extraction des huiles :

Notre partie expérimentale est réalisée dans le laboratoire au niveau du center de la recherche de la biotechnologie de Constantine.

Les méthodes d'extraction qui utilisée pour l'extraction des huiles végétale et essentielle sont l'hydrodistillation de type clevenger et l'extraction par solvant cyclohexane selon la méthode soxhlet.

#### IV.4.1. l'extraction par l'hydro-distillation :

Le principe de la technique d'hydro-distillation se base sur le pouvoir que possède-la Vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire une masse végétale d'anis vert qui est estimé par 50g dans un ballon en verre de 1L, on y ajoute une quantité suffisante d'eau de robinet 750 ml (sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition et le phénomène de stagnation). Ensuite le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. **Figure IV.3**

Avec un réglage du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction. Les vapeurs chargées d'huile essentielle de l'anis vert passent à travers le tube vertical (colonne de



## Chapitre IV

---

- 1- Réfrigérant
- 2- fluide frigorigène (gel bleue)
- 3- Chauffe ballon
- 4- Ballon
- 5- Matière à extraire (eau + anis vert)
- 6- Entrer et sortie d'eau refroidissement
- 7- Ampoule décanté
- 8- La couche d'HE



**Figure IV.4 : Formation d'huile essentielle**



**Figure VI.5: L'hydrolat de l'anis vert**

## Chapitre IV

Le rendement en huile essentielle s'exprime par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière végétale utilisée.

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R\% = \frac{PH}{PMV} \times 100$$

D'Où :

**R** : rendement de l'huile en pourcentage (%)

**PH** : poids de l'huile **1.2 (g)**

**PMV** : poids de la matière végétale **50g**

Après l'extraction d'huile essentielle de l'anis vert selon l'hydro-distillateur on obtient un volume de 0.7 ml (**figure IV.5**) d'huile essentielle et un rendement de **R% = 2,4%**

**Tableau IV.3: Présentation l'organoleptique d'huile essentielle obtenue**

<b>Etat</b>	<b>Liquid</b>
<b>Couleur</b>	June Clair Palme
<b>Odeure</b>	De anise
<b>Goût</b>	Sucre
<b>Figure IV.5</b>	

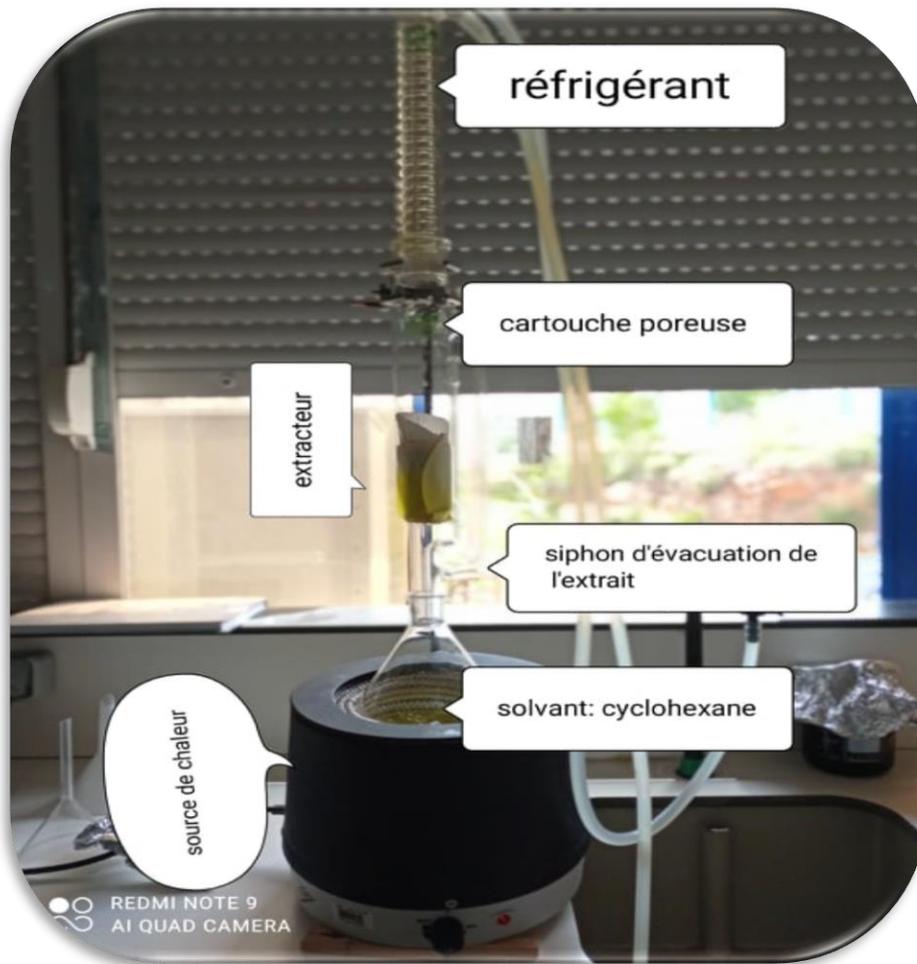
### **IV.4.2. Extraction par cyclohexane selon la méthode de Soxhlet pour l'extraction d'huile végétale:**

Le principe de cette méthode est d'extraire la matière grasse d'une substance solide par un solvant et avec un extracteur type Soxhlet.

Dans ce travail, ont été extraites l'huile végétale de la poudre des graines d'anise vert à l'aide d'un extracteur (Soxhlet) **figure IV.6**. Pour cela, on prend 31,27g de poudre de grains (pesés avec une balance électrique) **figure IV.7**, ensuite on place dans la cartouche en cellulose, puis dans l'extracteur de Soxhlet **figure IV.8**.

On remplit le tube de distillation de 100ml avec une double quantité de solvant (cyclohexane 200ml) **Figure IV. 9**. À l'aide d'un chauffe-ballon, porter le solvant à ébullition. Celui-ci passe par la tubulure 1 et est condensé par le réfrigérant. Il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire. Le réservoir se remplit. Dès que le niveau de solvant est à hauteur du coude 2, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné de la substance grasse. Le solvant continue de s'évaporer avec la répétition de cette opération jusqu'à en obtenir un solvant transparent (l'état initial) **Figure IV.10**, alors que les substances extraites restent dans le ballon, cette opération est prise plus de 8h.

L'huile qui est extraite **Figure IV.11** est placée dans le rota-vape pour assurer la vaporisation de toutes les substances du solvant restantes dans l'huile extraite pendant 2h et finalement on a obtenu une quantité d'huile végétale, qui a été estimée par 0.7g



**Figure IV. 6: extraction par sohxlet**



**Figure IV. 7 : Pesés de l'anis vert avec une balance électrique**



**Figure VI.8 : Cartouche en cellulose placer dans un extracteur (soxhlet)**



**Figure VI. 9: Rotation de solvant a l'état initial**



**Figure VI. 10: Cyclohexane**



**Figure VI.11 : Huile végétale d'anis vert**

Le rendement massique est le rapport entre la masse d'huile végétale extraite et la masse de matière végétale ayant subi l'extraction selon la formule suivante :

$$\text{rendement massique \textit{!}xtraction} = \frac{\text{masse huile extraite}}{\text{masse prise d'essai}} \times 100$$

**Masse d'huile extraite : 5(g)**

**Masse de la matière végétale : 31.27 (g).**

Après la réalisation de cette méthode on obtient une quantité d'huile végétale correspondant à la valeur 5g et un rendement de **R% = 15.98%**

## Chapitre IV

**Tableau IV.4 : Présentation de l'organoleptique de l'huile végétale obtenue**

Aspect	Liquide
Couleur	Marron à jaune
Odeur	Fraiche anisé
Goût	Sucré
Huile extrait	

**Tableau VI.5 : résultat et discussion final pour les 2 extractions**

rendement	Huile végétale	Huile essentielle
Noter épice	2.4%	15%
Tunisie [65]	-	1.26
Maroc [66]	-	3.25%

### IV.5. Caractéristique physique et chimique d'anis vert :

#### IV.5.1. l'indice de saponification :

C'est une caractéristique des acides gras libres Et estérifiés présents dans l'Echantillon analysé. et aussi c'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1 g de matière grasse.

## Chapitre IV

---

le Principes de l'ébullition à reflux Echantillon avec une solution Ethanoïque d'hydroxyde de potassium, puis titrage de l'excès d'hydroxyde de potassium, par une solution titrée d'acide chlorhydrique, et on utilise uniquement des réactifs de qualité reconnue et de l'eau déminéralisée ou de l'eau de pureté au moins équivalente , comme : Hydroxyde de potassium, Acide chlorhydrique ....

Pour la détermination de l'indice de saponification au début on dessouder une quantité de 2 g des graines d'anis vert dans un 100 ml de solvant (50 ml d'éthanol et 50ml d'éther di-éthylique) et on Agiter bien pour dissoudre le corps gras. Après on fait le Dosage de 10 ml de solution préparé dans un bécher et Ajouter 25mL de solution de KOH alcoolique, on Mettre au bain-marie bouillant pendant 45 à 60 minet Ajouter 2 ou 3 gouttes de phénolphtaléine. On Doser l'excès de KOH par la solution titrée d'acide chlorhydrique en agitant constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphtaléine.

D'autre part on déterminer au le volume de témoin par l'introduire dans un bécher 25mL de solution de KOH alcoolique et 10mL de solvant et Traiter dans les mêmes conditions opératoires que les essais (bain-marie).Ajouter 2 ou 3 gouttes de phénolphtaléine et titre jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphtaléine.

D'où :

$$I_s = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times 56.1}{m}$$

$I_s$  : indice de saponification

$V_T$  : volume versé au témoin : 98.5ml

$V_E$  : volume versé à l'essai : 88ml

$C_{HCl}$  : Concentration de la solution titrée d'acide chlorhydrique, 0.5 mol/L ;

**56,1** : (g/mol) masse molaire de KOH ;

$m$  : masse de corps gras analysée 2 g

On déduire que l'indice de saponification de l'anis vert estimé par :  **$I_s = 152.4$**

### IV.5.2. Indice d'iode :

Le principe de cet indice est addition à une prise d'essai d'une solution de mono chlorure d'iode dans un mélange formé d'acide acétique et de tétrachlorure de carbone. Après un temps donné de réaction, réduction de l'excès de mono chlorure d'iode par addition d'une solution d'iodure de potassium et d'eau et titrage de l'iode libère par une solution titrée de thiosulfate

## Chapitre IV

---

de sodium condition Les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique (comme Iodure de potassium, Empois d'amidon, Thiosulfate de sodium, Acide acétique cristallisable, Tétrachlorure de carbone, monochlorure d'iode ICl).

Pour déterminer l'indice de d'iode de l'anis vert on pèse une quantité de 0.1g, dans une nacelle en verre et introduire dans un flacon de 250 ml. On Ajoute 15 ml du tétrachlorure de carbone pour dissoudre la matière grasse et 25 ml du réactif mono-chlorure d'iode ICl après on bouché et agiter doucement et on place le flacon dans un endroit sombre durant 1h.

Après ce temps, on ajoute 20 ml de la solution d'iodure de potassium et 150 ml d'eau.

Ensuite, on titre la solution avec la solution de thiosulfate de sodium jusqu'à ce que la couleur jaune due à l'iode ait presque disparu et on Ajoute quelques gouttes de l'empois d'amidon et pour suivre le lit rouge jusqu'à moment où la couleur bleue disparaît après avoir agité très vigoureusement et déterminer le volume  $V_E$

On Réaliser un blanc (sans matière grasse) dans les mêmes conditions. Pour déterminer le volume de  $V_T$ .

D'où :

$$m_{I_2} = \frac{C_{S_2O_3^{2-}} \times 2 \times (V_T - V_E) \times M_{I_2}}{2}$$

$C_{S_2O_3^{2-}}$  = la concentration molaire en ions thiosulfate .

$m_{I_2}$  = la masse de d'iode.

$M_{I_2}$  = la masse molaire du d'iode.

Ensuite, il faut rapporter à 100 g d'anis vert :

- 0,093 g d' $I_2$  réagit avec 0,1g de corps gras
- x g de  $I_2$  réagissent avec 100 g de corps gras.

Alors la valeur de l'indice d'iode est estimé par : **Ii= 93**

On peut résumer les résultats au **Tableau VI.6**

**Tableau VI.6 : résultats de propriété chimique et physique avec référence indienne**

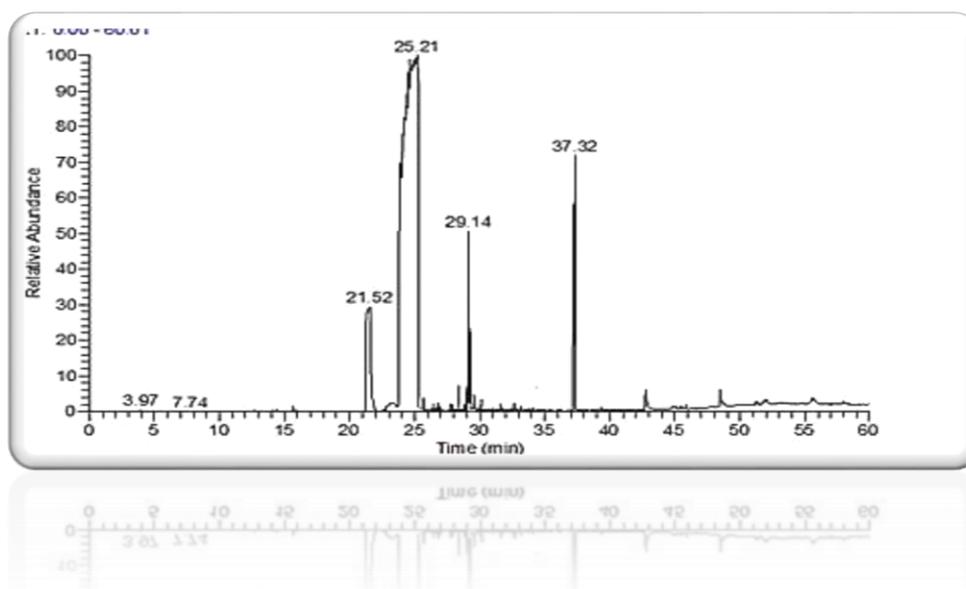
	Indice de saponification	Indice d'iode
<b>Notre épice</b>	152.4	93
<b>Inde [66].</b>	168.3	99

### IV.6. Analyse chromatographie de l'HE de Pimpinella anisume : [66]

Cette étude est réalisée au niveau d'université Fès à Tunisie d'où L'analyse de l'huile essentielle de PA est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (type Trace GC Ultra-Palarisq) associée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

L'analyse a été réalisée en injectant 1l de l'extrait, avec de l'hélium He comme gaz vecteur. La température de la colonne d'injection initiale est fixée à 40 °C pendant 2 minutes, puis à 280 °C, elle est augmentée de 10 minutes par pas de 5 °C/min. Le spectre de masse a été enregistré par le détecteur de type SCAN 50-650 et la bibliothèque de type NIST. L'appareil est contrôlé par un ordinateur avec un logiciel

Les composés volatils sont identifiés par leur spectre de masse et leur indice de rétention IR relatif calculé à partir du temps de rétention des composés séparés et des alcanes linéaires [68]. **Figure VI.12**



**Figure VI.12: Chromatographe obtenu par analyse CG/MS de l'huile essentielle de Pimpinella anisum à Tunisie.**

## Chapitre IV

Les résultats de cette étude sont montrés dans le **tableau IV.7**

**Tableau VI.7: Composition chimique de l'huile essentielle de pimpinella anisum**

Molécule	Formules	Pourcentage
<b>Trans-anéthole</b>	C10H12O	82,93
<b>Linalool</b>	C10H18O	8,31
<b>Aromadendrène</b>	C15H24	4,68
<b>Himachalène</b>	C15H24	3,56

Dans **Tableau VI. 8**, nous montrons les résultats de composition de l'huile essentielle d'anis vert de différentes parties du monde

**Tableau VI. 8: La composition de l'huile essentielle de l'anis vert de différentes régions du monde**

	Linalool (%)	Trans-anéthole (%)	(%)Himachalène	(%) Total
<b>Algérie</b>	0,3	92,4	1,1	93,5
<b>Athènes</b>	-	94.4	1.3	95.7
<b>Serbie</b>	-	96.8	1.84	98.64
<b>Turquie</b>	-	94.2	1.4	95.6

### IV.7.Conclusion :

Le rendement d'huile essentielle que nous avons l'extraire par HD estimé par la valeur 2.23 % est identifié dans la littérature entre l'intervalle de latitude 1.4-6% on déduit alors qu'on obtient un bon rendement si on le compare avec les autre espèces de la Tunisie et de Maroc.

Le rendement d'huile végétale qui était extrait par le soxhlet est estimé par la valeur 15.98% cette valeur est logique si on la compare avec les résultats obtenue dans la littérature.

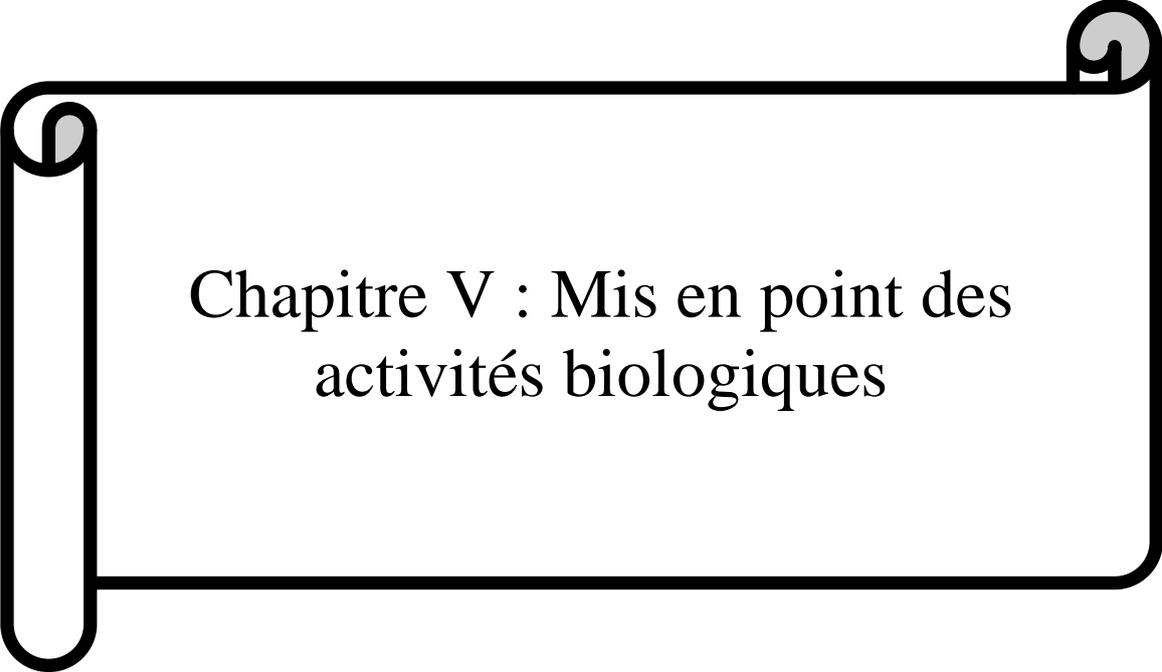
L'indice de saponification et L'indice diode sont respectivement  $I_s = 152.4$ ,  $I_i = 93$  ne sont pas trop loin de l'anis vert indien.

## Chapitre IV

---

La composition chimique qui a été réalisée en Tunisie par la chromatographie phase gazeuse couplée par la spectroscopie de masse il résulte que l'anis vert contient par une teneur élevée en trans-anéthol, atteignant 82,93 %. De plus, nous avons remarqué la présence de linalol (8,31%), Aromadendrène (4,68 %) et d'himachalène (3,56 %).

La composition chimique d'HE de *Pinpenella Anisum* de différents pays est presque la même sauf que l'anis vert Algérien contient de linalol avec un pourcentage de 3% comme un composé de plus, c'est un composé aromatique.



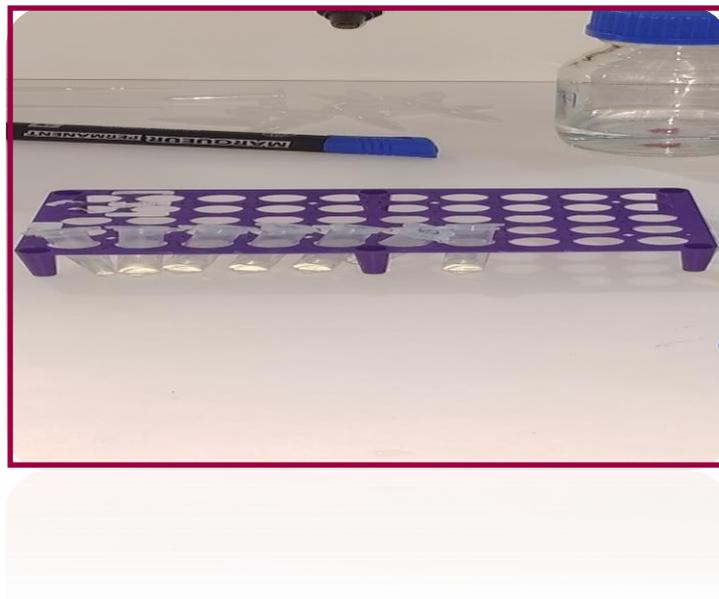
Chapitre V : Mis en point des  
activités biologiques

### V.1. introduction

Dans ce chapitre on va examiner des activités biologiques de l'anis vert qui a été acheté dans un herboriste à la région de Constantine et qui était un épice local ses activités sont réalisées au niveau de centre de recherche de la biotechnologie-Constantine- par l'évaluation in vitro des activités anti-oxydantes, antidiabétique et anti-cholinestérase.

### V.2. Activités anti-oxydantes :

Avant de commencer notre travail et après qu'on termine l'extraction on fait diluer nos extraits des huiles végétales et essentielles où on obtient sept concentrations différentes de plus au moins concentré sont mises dans des eppendorf et sont représentés dans **Figure V.1**



**Figure V.2: les extraits dilués**

L'étude de l'activité antioxydant de l'anis vert a été testée selon cinq méthodes : piégeage du radical libre DPPH, méthode CUPRAC, pouvoir réducteur (FRAP), réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phenanthroline, piégeage de l'ABTS.

La capacité anti-oxydante totale (TAC) des échantillons/standard a été déterminée par la méthode rapportée par **Prieto et al [67]** avec de légères modifications.

0,5 ml d'échantillons/étalon à différentes concentrations a été mélangé avec 3 ml de réaction mélange contenant 0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de sodium phosphate et 1% de molybdate d'ammonium dans le test tuyaux. Les tubes à essai ont été incubés à 95°C pendant 10 minutes pour terminer la réaction. L'absorbance était mesurée à 695 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre contre blanc après refroidissement à TA. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon de référence. Augmentation de l'absorbance de la réaction mélange indiqué augmenter la capacité anti-oxydante totale

### V.2.1. Activité anti radicalaire au DPPH :

#### a) Principe et méthode :

L'activité de piégeage des radicaux libres a été déterminée spectrophotométriquement par le test DPPH décrit par **Blois [68]**, avec de légères modifications.

Sous sa forme radicalaire, DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant ou une espèce radicale, son absorption diminue.

Brièvement, on met 120 µL d'éthanol et 40 µL de solutions d'échantillons, dissoutes dans l'éthanol à différentes concentrations, ont été mélangées. La réaction a ensuite été initiée par l'ajout de 0,4 mM 40 µL de DPPH préparé dans de l'éthanol. 30 minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits.

L'éthanol a été utilisé comme témoin. Une diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée.

La capacité de piégeage du radical a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$(\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Où :

**A<sub>0</sub> (contrôle)** : l'absorbance du blanc DPPH solution

**A** : l'absorbance finale de la solution testée échantillon après 30 min d'incubation.

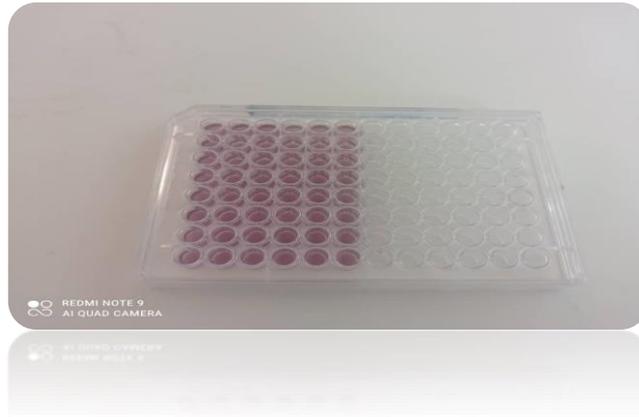
#### b) Procédure

160 µl (DPPH) + 40 µl (extrait) + lecture 517

Dans cette étude, l'activité anti-radicalaire des extraits d'huile essentielle et l'huile végétal d'anis vert a été évalué par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % (CI<sub>50</sub>), en se basant sur la capacité d'une substance à réduire le radical DPPH, par rapport à un antioxydant standard trolox et ascorbic acide.

Les résultats sont présentés dans **Figure V.3** et **Tableau V.1**:

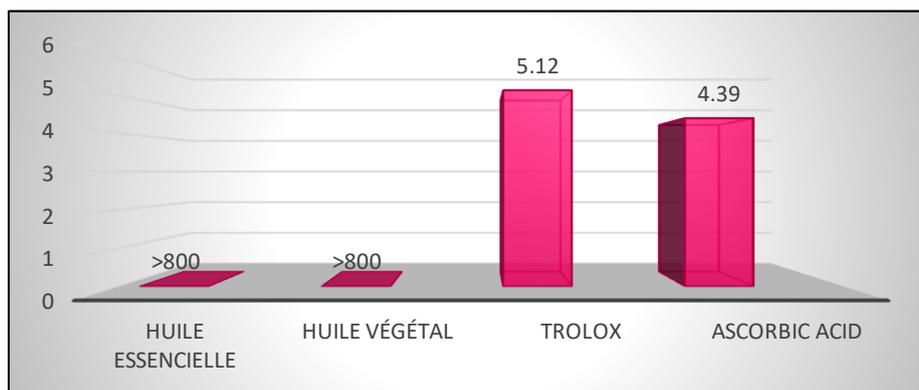
## Chapitre V



**Figure V.4:** La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) par les extrait HE et HF d'anis vert

**Tableau V.1 :** Inhibition du radical DPPH par les extraits HE et HF de l'anis vert :

Extraits	12.5	25	50	100	200	400	800	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HE	NA	NA	NA	NA	NA	3,99±1,14	5,69±1,62	>800
HF	NA	NA	NA	NA	NA	12,02±3,11	21,91±0,10	>800
[ ] standard	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Trolox	6.42±0.91	13.33±2.14	30.19±0.67	61.48±2.98	87.16±0.28	88.46±0.11	87.72±0.47	5.12±0.21
Ascorbic acid	0.31±1.02	12.90±0.28	29.69±0.39	76.67±0.37	84.94±0.84	87.78±0.49	86.36±0.21	4.39±0.01



**Figure 5:** Valeurs des CI<sub>50</sub> du test DPPH pour les extraits des HE et HF d'anis vert

Cette activités représente que l'huile essentielle et végétal d'anis vert a une faible activité (IC<sub>50</sub>>800) par rapport au standards trolox (IC<sub>50</sub>= 5.12±0.21) et ascorbic acid (IC<sub>50</sub>=4.39±0.01) (**figure 3, tableau 1**)

### V.2.2. Activité du piégeage du cation radical $ABTS^+$ :

#### a) Principe et méthode :

L'activité a été déterminée selon la méthode de **Re et Al**, avec de légères modifications. L' $ABTS^+$  a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans  $H_2O$  et 2,45 mM de persulfate de potassium, conservé dans l'obscurité à la pièce température pendant 12 h. Le cation radical était stable dans cette forme pendant plus de 2 jours lorsqu'il est stocké dans l'obscurité à la pièce Température. Avant utilisation, la solution  $ABTS^+$  a été diluée pour obtenir une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm avec éthanol. Ensuite, 160 L de solution  $ABTS^+$  ont été ajoutés à 40  $\mu L$  de la solution d'échantillon dans l'éthanol à différents concentration. Après 10 min, en utilisant une microplaque 96 puits pour la lecteur, le pourcentage d'inhibition à 734 nm a été calculé pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc (éthanol). La capacité de balayage d' $ABTS^+$  était calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$ABTS (\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Où :

**A<sub>0</sub> (contrôle)** : l'absorbance du blanc ABTS solution

**A** : l'absorbance finale de la solution testée échantillon après 6 min d'incubation.

#### b) Procédure :

160  $\mu l$  ( $ABTS^+$ ) + 40  $\mu l$  (extrait) + attendre 10 mn + lecture à 734 nm

Dans ce test, l'antioxydant réagit avec  $ABTS^+$  de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour redonner l' $ABTSH^+$  incolore. Cette transformation a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards trolox et acide ascorbic. Les résultats obtenus sont illustrés dans **Figure V.6** et **Tableau V.2** ;

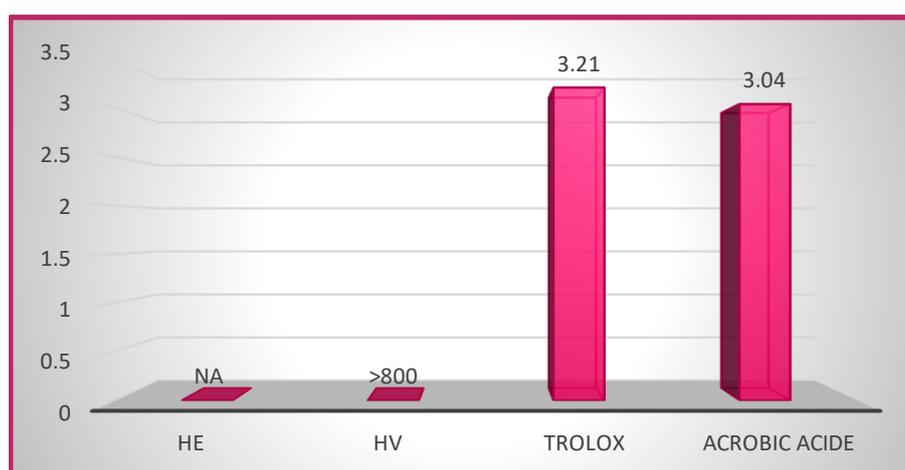
## Chapitre V



**Figure V.7:** La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{*+}$  des extraits HE et HF d'anis vert

**Tableau V.2 :** Inhibition du cation radical  $ABTS^{*+}$  par les extraits HE et HF d'anis vert :

Extraits	12.5	25	50	100	200	400	800	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HE	NA							
HF	NA	NA	NA	NA	6,46±2,57	10,38±1,65	25,63±3,53	>800
[ ] standard	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Trolox	14.74±0.37	26.15±0.65	51.70±1.51	89.72±0.67	92.89±0.19	92.89±0.19	91.84±1.19	3.21±0.06
Ascorbic acid	13.43±0.82	28.76±0.67	52.94±0.94	93.21±0.11	93.08±0.19	92.40±0.88	92.96±0.11	3.04±0.05



**Figure 8:** valeur d'IC<sub>50</sub> de test  $ABTS^{*+}$  d'HE et HF d'anis vert

Dans ce test, on remarque que la capacité de piégeage des radicaux libres présentée par L'huile essentielle est non absorbante à L' $ABTS^{*+}$  et pour l'huile végétal on remarque une

faible activité ( $IC_{50} > 800 \mu\text{g/ml}$ ) par rapport au standard  $IC_{50}$  (trolox =  $3.21 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$  et ascorbic acide =  $3.04 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ )

### V.2.3. Activité biologique : réductrice du cuivre (CUPRAC)

#### a) Principe et méthode :

La capacité antioxydant réductrice du cuivre a été déterminée selon la méthode d'Apak et al. avec une légère modification.

A chaque puits, en plaque 96 puits, 50  $\mu\text{L}$  10 mM Cu(II), 50  $\mu\text{L}$  7,5 mM néocuproïne et 60  $\mu\text{L}$  Des solutions de tampon  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 M, pH 7,0) ont été ajoutées. Quarante microlitres d'extrait à différentes concentrations a été ajouté au mélange initial de manière à faire le final volume 200  $\mu\text{L}$ . Après 1 h, l'absorbance à 450 nm était enregistré contre un blanc réactif à l'aide d'une microplaque à 96 puits lecteur. Les résultats ont été donnés en absorbance et comparés Avec ceux du trolox et d'acide ascorbic utilisé comme antioxydant normes (standards).

#### b) Procédure:

L'activité Cupric C'est une réaction de réduction du complexe cuivre-néocuproïne  $[\text{Nc}_2\text{-Cu}^{2+}]$ , le dosage de cette réaction est mesuré à titre de valeurs  $A_{0.50}$  des extraits de *l'anis vert* et des standards trolox et acide ascorbic mentionnées dans **Figure V.6** et **Tableau V.3**:

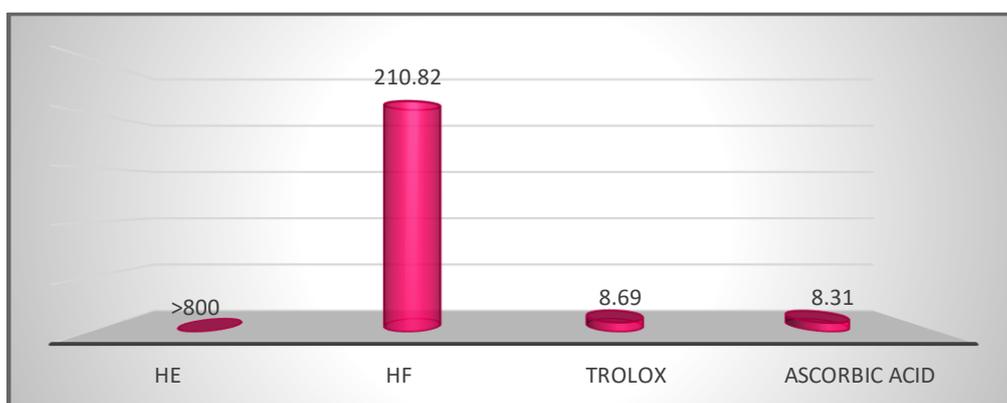


**Figure V.9 : Plaque de dosage de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits d'HE et HF d'anis vert**

## Chapitre V

**Tableau.3:** La capacité antioxydant de réduction du cuivre des extraits HE et HF de L'anis vert

Extraits	12.5	25	50	100	200	400	800	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
HE	0,09±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00	0,10±0,01	0,12±0,02	0,13±0,02	>800
HF	0,14±0,00	0,18±0,02	0,26±0,02	0,36±0,01	0,49±0,01	0,70±0,01	0,88±0,11	210,73±2,20
Concentration des standards	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5	25	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
Trolox	0.12±0.01	0.14±0.00	0.18±0.01	0.25±0.00	0.40±0.01	0.67±0.02	1.34±0.13	8.69±0.14
Ascorbic acid	0.11±0.01	0.12±0.01	0.18±0.03	0.24±0.01	0.41±0.01	0.71±0.02	1.38±0.11	8.31±0.15



**Figure V.10:** Valeurs des A<sub>0,50</sub> du test CUPRAC pour les extraits d'HE et HE de l'anis vert

La présente étude a montré que l'extrait HE (A<sub>0,50</sub>>800µg/ml) possède une faible activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne par rapport au standard BHA (A<sub>0,50</sub>=8.69±0.14µg/ml). Par contre, l'extrait d'huile végétal est plus actif 25 fois plus que les standards BHA et BHT (A<sub>0,5</sub>=8.69±0.14) et (A<sub>0,5</sub>=8.31±0.15) c'est-à-dire qu'il a une excellente activité. **(Tableau 3, Figure7).**

### V.2.4.activités biologique : pouvoir réducteur (FRAP)

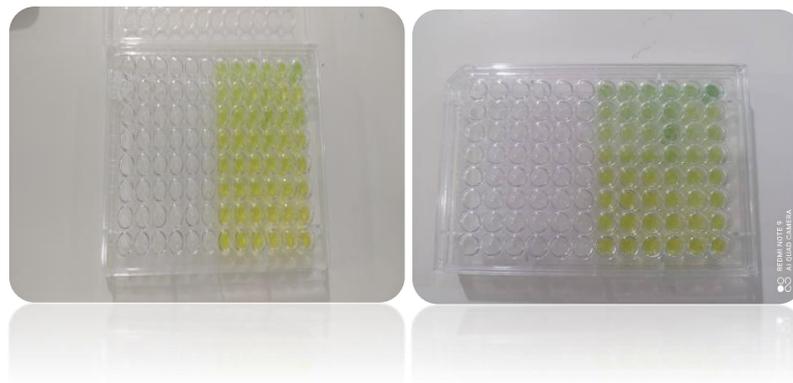
#### a) Principe et méthode :

Le dosage FRAP a été déterminé selon la méthode décrite par **Benzie et Strain** . Brièvement, un tampon acétate 300 mM de pH 3,6, 10 mM 2, 4, 6-tri-(2-pyridyl)-1, 3, 5-triazine et 20 mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ont été mélangés ensemble dans le rapport de 10:1:1 respectivement, pour donner le réactif FRAP de travail. Une aliquote de 50 l de l'extrait à 0,1 mg/ml et 50 µl (20-100 g/ml) de solutions étalons d'acide ascorbique ont été ajouté à 1 ml de réactif FRAP. La mesure de l'absorbance a été prise à 593 nm. Le pouvoir réducteur a été exprimé en concentration équivalente qui est définie comme la concentration d'antioxydant qui a donné une capacité de réduction ferrique équivalente à celle de l'acide ascorbique et trolox (les standards).

#### b) Procédure

10 µl extrait + 40 µl phosphate buffer (pH 6.6) + 50 µl potassium ferricyanide (1%) .

Le suivi de cette activité est basé sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) de couleur jaune en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>) de couleur bleu verte en mesurant les valeurs de A<sub>0,50</sub> et par comparaison avec les standards acide ascorbique et trolox , le test nous a permis d'obtenir les résultats montré dans **Figure V.11** et **Tableau V.4** :

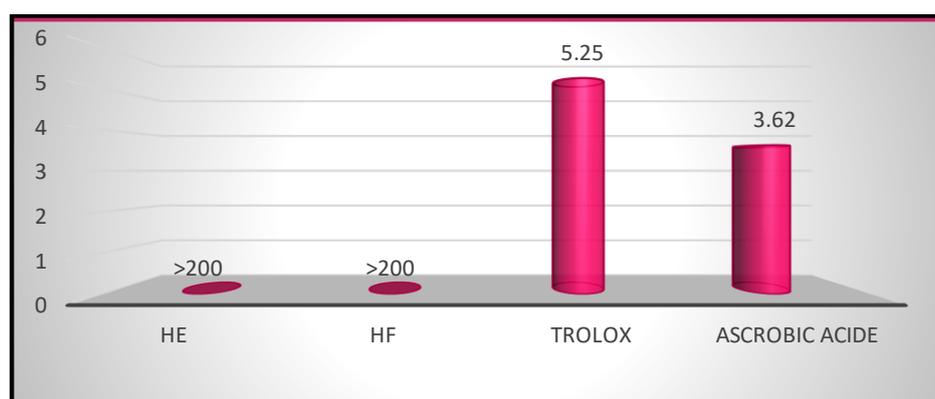


**Figure V. 12:** plaque de dosage de FRAP des extraits HE et HF de l'anis vert

## Chapitre V

**Tableau V.4:** Absorbance du pouvoir réducteur FRAP par les extraits de *l'anis vert* :

Extraits	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
HE	0.05±0.01	0.05±0.00	0,05±0.01	0,06±0.01	0.09±0.00	0,11±0,04	0,22±0.05	>200
HF	0.05±0.01	0.05±0.00	0.06±0.01	0.08±0.02	0.10±0.01	0.15±0.01	0,21±0.02	>200
Concentration des standards	0.0976µg	0.195µg	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
Trolox	0.07±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.13±0.00	0.19±0.02	0.28±0.05	0.60±0.04	5.25±0.20
Ascorbic acid	0.07±0.00	0.09±0.01	0.12±0.01	0.17±0.01	0.25±0.02	0.47±0.03	0.79±0.09	3.62±0.29



**Figure V. 13 :** Valeurs des A<sub>0,50</sub> du test pouvoir réducteur pour les extraits HE et HF de l'anis vert

Les résultats obtenus montrent que les extraits HE et HF de l'anis vert ont une faible capacité de réduire le fer ( $A_{0.5} > 200$ ) (tableau, figure) par rapport au standards trolox ( $A_{0.5} = 5.25 \pm 0.20$ ) et Ascorbic acide ( $A_{0.5} = 3.62 \pm 0.29$ )

### V.2.5. Activité biologique : Phénanthroline :

L'activité de réduction par la formation du complexe  $Fe^{+2}$  phénanthroline des extraits a été mesurée selon la méthode décrite par **Szydłowska-Czerniaka**. Des extraits de différentes concentrations, de volume de 10 µl ont été ajoutés à une solution de : 50 µl  $FeCl_3$  (0.2%), 30 µl Phénanthroline (0.5%) et 110 µl de méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à l'étuve à température de 30°C. L'absorbance a été déterminée à 510 nm. Les résultats ont été calculés à titre d'A<sub>0,5</sub>(µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

## Chapitre V

### b) Procédure :

10  $\mu\text{l}$  extrait + 50  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_3$  (0.2%) + 30  $\mu\text{l}$  Phénanthroline (0.5%) + 110  $\mu\text{l}$  MeOH + incubation à l'obscurité pendant 20 min à 30°C + lecture à 510 nm.

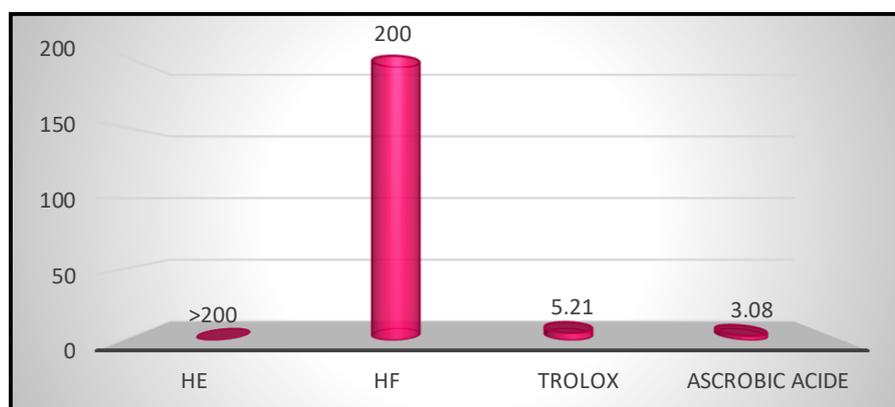
Le trolox est utilisé comme standard.



**Figure V.14:** plaque de dosage de phénanthroline pour les extraits HE et HF de l'anis vert

**Tableau V.5 :** absorbance de phénanthroline par l'extrait HE et HF de l'anis vert :

Extraits	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
HE	NA	NA	NA	NA	NA	0,36 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,00	>200
HF	NA	NA	0,34 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,03	200,00 $\pm$ 8,66
Concentration des standards	0.0976 $\mu\text{g}$	0.195 $\mu\text{g}$	0.390 $\mu\text{g}$	0.781 $\mu\text{g}$	1.562 $\mu\text{g}$	3.125 $\mu\text{g}$	6.25 $\mu\text{g}$	$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Trolox	0.25 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.00	0.32 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.02	5.21 $\pm$ 0.27
Ascorbic acid	0.26 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.00	0.29 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.00	3.08 $\pm$ 0.02



**Figure V. 15:** Valeurs des  $A_{0,50}$  du test d'absorbance de phénanthroline par HE et HF de l'anis vert

## Chapitre V

---

La présente étude a montré que l'extrait de HF ( $A_{0,50}=200\pm 8.68 \mu\text{g/ml}$ ) possède une excellente activité de réduction  $\text{Fe}^{2+}$  par rapport aux standards.

Par contre la même étude possède une faible activité d'huiles essentielles ( $A_{0,50}>200$ ) par rapport aux standards ( $A_{0,50}=5.21\pm 0.27$ ) et ( $A_{0,50}=3.08\pm 0.02$ ).

### V.2.6. Test d'inhibition de l'alpha- amylase :

#### a) Principe et méthode :

L'amylase de mammifère, sécrétée par la glande pancréatique et de la salive comme étant une enzyme glycolytique à travers le suc pancréatique dans l'intestin, est l'enzyme clé qui catalyse la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (glucides). Les inhibiteurs de l'hydrolyse des hydrates de carbone par l'amylase dans le tractus digestif retardent leur digestion et prolongent son temps, causant une réduction dans le taux d'absorption du glucose, et par conséquent diminution des niveaux de glucose plasmatique et abaissement de l'hyperglycémie.

Le dosage contenait 200 L de substrat (amylose ou amylopectine) et d'enzyme, 50  $\mu\text{L}$  de PBS et 50  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur de différentes concentrations. Pour le test de contrôle, l'inhibiteur a été remplacé par un volume égal de PBS. Des solutions mères d'amylose et d'amylopectine (2,5 mg/mL) ont été préparées dans de l'eau par chauffage à 90 °C sur plaque chauffante pendant 15 min. Une seconde solution mère d'amylopectine a été préparée à 0,925 mg/mL. Humain solution mère d' $\alpha$ -amylase salivaire (1,25 U/mL) a été préparée dans PBS. La solution mère d'enzyme et le mélange de dosage contenant l'inhibiteur, le PBS et le substrat ont été pré-incubés à 37 °C dans un bain-marie pendant 10 min et la réaction a commencé en ajoutant l'enzyme à la solution de dosage. La réaction était des effets comprenant des flatulences, de la diarrhée et des nausées. Des aliments fonctionnels pourraient à terme être développés contenant des composants capables d'inhiber l' $\alpha$ -amylase, une action semblable à l'acarbose mais sans les effets secondaires.

#### d) Procédure :

25  $\mu\text{l}$  extrait + 50  $\mu\text{l}$  (solution  $\alpha$  amylase 1U) : incubation pendant 10 min à 37 °C + 50  $\mu\text{l}$  d'amidon 0.1% : incubation pendant 10 min à 37 °C + 25  $\mu\text{l}$  HCl (1M) + 100  $\mu\text{l}$  IKI + lecture à 630 nm.

## Chapitre V

Calcul de pourcentage d'inhibition d'alpha amylase :

$$\%INH = 1 - [(A_c - A_e) - (A_s - A_b)] / (A_c - A_e) * 100$$

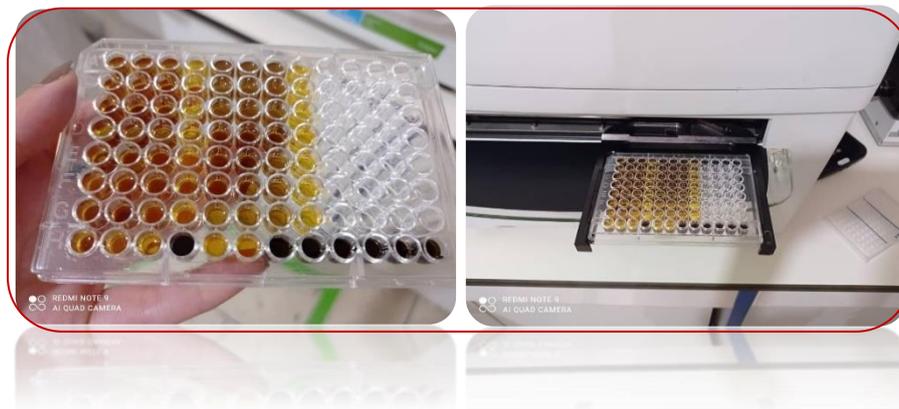
$A_c$  = Absorbance [Amidon +IKI +HCl+ Vol de solvant d'extrait +Vol tampon Enzyme]

$A_e$  = Absorbance [Enzyme +Amidon +IKI+HCL+ Vol de solvant d'extrait]

$A_s$  = Absorbance [Enzyme +Extrait + Amidon +IKI + HCl]

$A_b$  = Absorbance [Extrait+IKI+125µl de tampon]

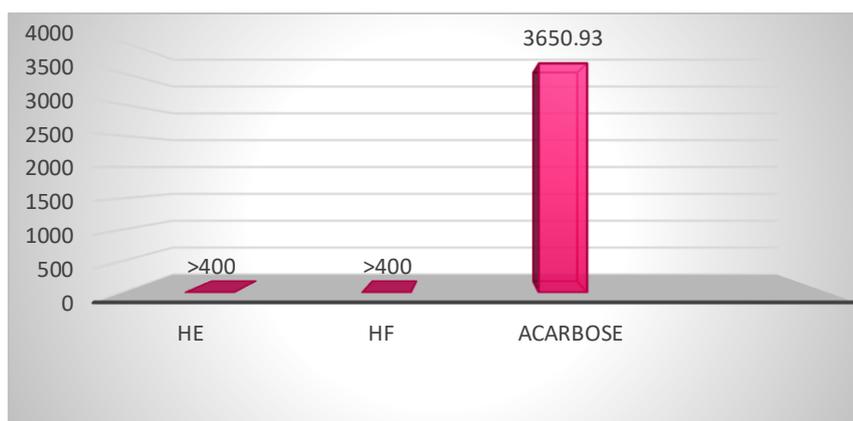
Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase des extraits d'huiles végétal et essentielle d'anis vert a été évaluée par la détermination des concentrations inhibitrices  $CI_{50}$  par rapport au standard l'acarbose en se basant sur la capacité d'une substance à inhiber cette enzyme. Les résultats sont présentés au suivant :



**Figure V. 16:** plaque de dosage de alpha amylase de HE et HV d'anis vert

**Tableau V-6:** inhibition de l'alpha- amylase des extraits HE HF d'anis vert

Extraits	% d'inhibition							
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC50 (µg/ml)
HE	NA	NA	NA	NA	NA	15,91±1,00	17,67±2,20	>400
HF	NA	NA	NA	NA	NA	13,90±2,99	44,17±2,41	>400
[ ] standard	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC50 (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70



**Figure V.17:**valeurs d'IC<sub>50</sub> de test d'inhibition alpha amylase par HE et HF d'anis vert

D'après les résultats obtenus (Tableau6, Figure13), on remarque que l'activité inhibitrice d'alpha amylase a été pratiquement faible pour l'huile essentielle et aussi pour l'huile végétale (IC<sub>50</sub> >400) pour les deux extraits par rapport au standard Acarbose (IC<sub>50</sub>= 3650,93±10,70)

### V.2.7 Activités biologiques : UREASE

#### a) principe et méthode:

L'uréase (découverte en 1876 par Musculus<sup>2</sup>) est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac :



L'uréase est présente chez des bactéries, des levures et chez certaines plantes.

Cette enzyme est un critère biochimique de différenciation très utilisé lors de l'identification bactérienne.

L'activité inhibitrice de l'uréase a été déterminée en mesurant la production de l'ammoniac

Utilisant la méthode de l'indophénol telle que décrite par **Weatherburn**.Brièvement, le mélange réactionnel contenant 25 µl de solution enzymatique (Jack bean urease), 10 µl du composé testé et 50 µl d'urée.

La solution a été incubée à 30 °C pendant 15 min dans une plaque à 96 puits.

45 µl de réactif phénol et 70 µl de réactif alcalin ont été ajoutés dans chaque puits.

Après 50 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques 96 puits (PerkinElmer, EnSpire Multimode Lecteur de plaques, États-Unis). La thiourée a été utilisée comme inhibiteur standard.

## Chapitre V

Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition (%) de l'enzyme à 200 g/mL de concentration du composé testé. L'inhibition de l'uréase l'activité a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{inhibition d'uréase} = \left[ \frac{A_0 - A}{A_0} \right] \times 100$$

**A<sub>0</sub> (contrôle)** : l'absorbance du blanc de solution d'uréase

**A** : l'absorbance finale de la solution testée échantillon après 30 min d'incubation



**Figure V. 18: plaque d'inhibition d'uréase**

**NB** : cette activité n'est pas active avec nos extraits d'huile fixe et essentielle d'anis vert

### V.2.8. Activité biologique : Anti-cholinestérase.

#### a) Principe et méthode d'Inhibition de l'acétylcholinestérase :

L'activité a été mesurée en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrie développée par **Ellman [69]**.

L'AChE de l'anguille électrique du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction.

Le DTNB a été utilisé pour la mesure du cholinestérase

La méthode brièvement, 150 L de phosphate de sodium 100 mM tampon (pH 8,0), 10 L de la solution d'échantillon dissous dans éthanol à différentes concentrations et 20 µL d'AChE dans le tampon a été mélangée et incubée pendant 15 min à 25 °C, et 10 L de DTNB 0,5 mM ont été ajoutée. La réaction est alors initiée par l'addition de 0,71 mM, 10 L d'iodure d'acétylthiocholine, l'hydrolyse de ces substrats a été suivie par spectrophotométrie par la formation de 5-thio-2-jaune anion nitrobenzoate résultant de la réaction de DTNB avec

## Chapitre V

thiocholine, libéré par l'enzyme hydrolyse de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. La galantamine a été utilisé comme composé de référence.

### Procédure :

- **Solution tampon:**

✓ 8,890 g de (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) + 500 ml de H<sub>2</sub>O → V1

✓ -1,56 g de (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) + 100 ml de H<sub>2</sub>O → V2

V1 +V2 → Solution Tampon comme le montre le tableau suivant

On ajoute du NaOH pour augmenter la valeur du PH

**Tableau.V.8:** préparation des solutions tampons :

PH	5,8	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)	92	81,5	73,5	62,5	51	39	28	19	13	8,5	5,3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	8	18,5	26,5	37,5	49	61	72	81	87	91,5	94,5

Le pourcentage d'inhibition d'AChE enzymes est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule :

$$(E - S)/E *100.$$

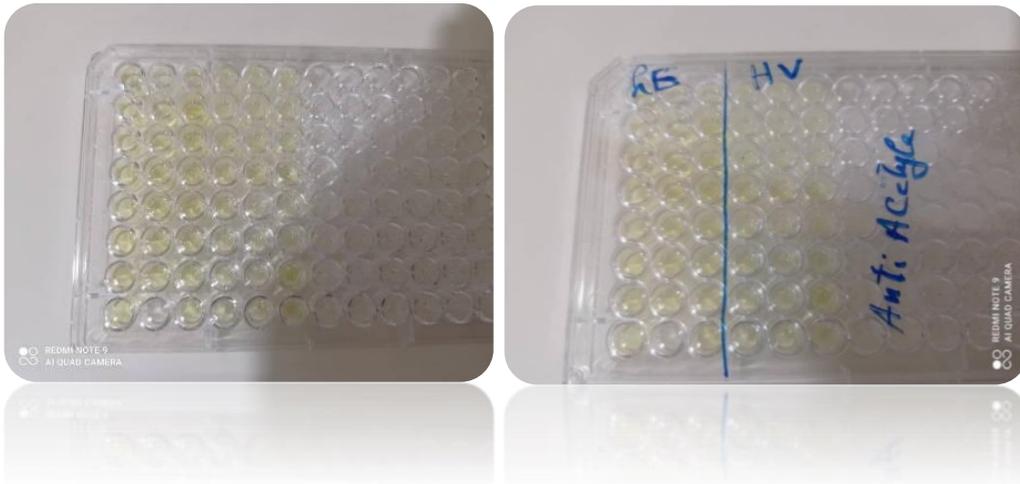
E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

Le Galantamine est utilisé comme référence.

Cette inhibition est suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice (CI<sub>50</sub>) des différents extraits en comparaison avec le standard la galantamine. Les résultats obtenus sont représenté par **Figure V. 19** et **Tableau V.9**

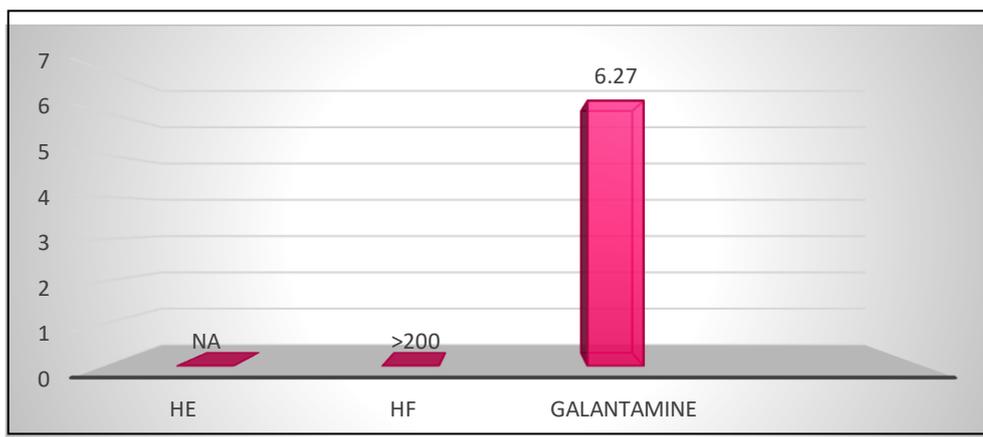
## Chapitre V



**Figure 20:** plaque de dosage Anticholinesterase des extraits HE et HF d'anis vert

**Tableau V.9:** activité d'inhibition de Acetylcholinesterase:

Extraits	% d'inhibition							IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	
1	NA	NA	NA	NA	NA	15,91±1,00	17,67±2,20	>400
2	NA	NA	NA	NA	NA	13,90±2,99	44,17±2,41	>400
[ ] standar	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70



**Figure V.21 :** valeurs de IC<sub>50</sub> de test d'inhibition d'Anti-cholinesterase des extraits HE et HF d'anis vert

A partir du Tableau qui présent le pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraitsle premier c'est l'huiles essentielle qui n'est pas actif pour inhibé la BChE et l'autre

## Chapitre V

c'est l'huile végétale de l'anis vert qui était faible ( $IC_{50} >200$ ) par rapport au standard Galantamine ( $IC_{50}=6.27\pm 1.15$ ).

### Récapitulatif sur toutes les activités examinées:

Activités extrait	DPPH	ABTS <sup>+</sup>	CUPRAC	FRAP	PHNANTROLINE	Alpha- amylase	Anti- cholinestérase	uréase
Huile essentielle	-	-	-	-	-	-	-	-
Huile végétal	-	-	+	-	+	-	-	-

### V.3.Conclusion :

La faible activité anti-oxydantes ou bien enzymatique de notre huile essentielle et végétale de la plantes de l'anis vert due à leurs compositions chimique qui n'était pas riche en polyphénole qui ont prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé.

L'activité anti-oxydante a été évaluée en utilisant cinq méthodes :(DPPH, ABTS<sup>+</sup>) les résultats d'Inhibition sur les huiles essentielles sont les suivantes respectivement : $CI_{50}$  (>800, NA) CUPRAC,FRAP et PHENANTROLINE l'absorbance respectivement est  $A_{0,5}$  (>800, >200, >200 ) donc ont une faible activités par rapport aux standards la même choses pour l'inhibition anti-enzymatique ou on utilisant trois méthodes : (antidiabétique, uréase et anti-cholinestérase) on obtient les résultats suivants respectivement  $CI_{50}$  (>400, NA, >400) ont toujours faible par rapport aux standards.

Pour l'huile végétale nous avons fait les mêmes activités et on obtient les résultats d'inhibitions suivantes pour (DPPH, ABTS<sup>+</sup>)  $CI_{50}$  (>800, >800) et pour (CUPRAC, FRAP et PHENANTROLINE)leurs absorbance respectivement  $A_{0,5}$ (**210,73±2,20**,>200, **200,00±8,66** ) alors on remarque une excellente activités pour la réduction du complexe cuivre-néocuproïne [ $Nc_2-Cu^{2+}$ ] et réduction par la formation du complexe  $Fe^{+2}$  phenanthroline par rapport au standards trolox et ascorbic acid

A propos des activités anti-enzymatique l'huile végétal d'anis vert a une faible activité anti diabétique ( $IC_{50}>400$ ) et anti-uréase qui n'est pas actif et anti-alzimeur ( $IC_{50} >400$ ) par rapport aux standards

## Chapitre V

---

En effet, le rôle antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neuro-dégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

## Conclusion Générale

Les plantes médicinales ont pour but de traiter naturellement toute une variété de maladies. Des recherches scientifiques modernes ont assuré l'efficacité de ces plantes grâce à leur richesse en métabolites secondaires qui leur confèrent des propriétés biologiques diverses. Les objectifs de ce travail ont consisté en la réalisation d'extraction d'huile végétale et essentielle de l'espèce végétale *PINPENELLA ANISUM*, l'huile essentielle était extraire par la technique conventionnelle de CLEVANGER (hydro-distillation) et l'huile végétale (fixe) avec le Soxhlet.

La technique assistée par hydro-distillation a permis d'avoir un rendement est de l'ordre 2.4% qui était logique et dans les normes trouver dans la littérature.

L'huile végétale on l'extraire avec soxhlet à l'aide d'un solvant apolaire (cyclohexane) pendant 8h où on obtient un bon rendement estimé de 15.98%, cette valeur est dans l'intervalle de l'altitude existante dans la littérature.

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, odeur, couleur) de notre huile essentielle présente un aspect liquide, transparent à jaune pâle, l'odeur dégager est anisé et goût sucré. Pour l'huile fixe on obtient un aspect liquide huileux (gras) avec une couleur jaune vers le marron, odeur fraîche anisé et gout sucré.

La caractérisation physico-chimique traduits la qualité de notre huile végétale en terme de pureté avec un indice de saponification et un indice d'iode.

L'indice de saponification et l'indice d'iode sont évalué par une analyse quantitative avec technique de titrimétrie ou ont obtient les résultats suivantes :  $I_s = 152.4$ ,  $I_i = 93$ , une simple comparaison montre que nos caractère physico-chimique compatible avec la littérature.

La composition chimique d'huile essentielle de *PINPENELLA ANISUM* a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse coupler à la spectroscopie de masse qui montre que notre huile est composé de : Trans-anéthole 92,4%, Linalool 0,3%, Aromadendrène 4,68%, Himachalène 1.1% si on compare ses composé avec la même plante de différent pays on constate les même composé sauf linalool et Aromadendrène sont des composé aromatiques.

Dans ce contexte de recherche de nouvelles molécules naturelles, nous nous sommes intéressés à effectuer une évaluation *in-vitro* des activités biologiques anti-oxydantes et enzymatique de ces huiles.

Une bonne activité anti-oxydante est une propriété très recherchée dans de nombreux domaines, en agroalimentaire ou en pharmaceutique par exemple. Comme expliqué dans la bibliographie, un déséquilibre de la balance naturelle antioxydant dans le corps peut provoquer divers types de dégâts cellulaires et causer différentes maladies.

En agroalimentaire, les antioxydants permettent de limiter la dégradation des aliments due à l'oxydation de divers composés.

Dans notre étude nous avons réalisé cinq activités anti-oxydantes pour chaque huile plus une activité antidiabétique, anti-uréase et anti-alzaimneur et pour chaque activités on obtient les résultats suivants :

- Faible activités anti-radicalaire **DPPH (IC<sub>50</sub> >800 µg/ml)** pour les huiles essentielles et fixe
- Une faible activité anti-radicalaire **ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> >800 µg/ml)** pour les deux extraits
- Une très bonne activité réduction du complexe cuivre-néocuproïne **CUPRAC** pour l'huile fixe (A<sub>0,5</sub> =210,73±2,20) et une faible activité pour l'huile essentielle (A<sub>0,5</sub> >800µg/ml)
- Une faible activité de pouvoir réducteur **FRAP** pour les deux extraits (A<sub>0,5</sub> >200 µg/m)
- on obtient une excellente activité de réduction de **phénantroline** pour l'huile fixe (A<sub>0,50</sub>=200±8.68 µg/ml) et une faible activité pour HE d'anis vert.
- Pour les cinq activités les résultats sont toujours comparer par rapport au **trolox** et **l'acide ascorbic** qui sont utilisés comme standards antioxydants (étalons).
- Pour l'activités **antidiabétique (inhibition d'alpha amylase)** on trouve une faible activités (IC<sub>50</sub>>400 µg/ml) **pour les deux extraits par rapport au** Acarbose(IC<sub>50</sub>= 3650,93±10,70) qui était utilisé comme standard
- Pour **l'inhibition d'uréase** nos huiles essentielle et fixe ne sont pas actives.
- A propos **d'inhibition cholinistérase** nous avons une faible activité pour nos deux extraits (IC<sub>50</sub> >400µg/ml) par rapport au standard (IC<sub>50</sub>=3650,93±10,70)

On constate généralement que nos extraits ont une faible activité mais il reste l'huile fixe à un effet antioxydant plus fort que celle de l'huile essentielle.

Petite recherche bibliographique nous a permet de savoir que plus la plante ou l'extrait à utiliser riche en polyphénols et en flavonoïde plus ont un effet antioxydant plus élevé.

Aussi, il 'est intéressants de faire une analyse CG/MS pour présenter les composer juste existante dans notre huiles essentielle et fixe, ainsi de travailler sur une partie modélisation et optimisation pour obtenir un maximum de rendement possible de notre plante

## Bibliographique

- [1] : Limet H. Pharmacopée et parfumerie sumériennes. Rev Hist Pharm. 1978;66(238):147-59.
- [2] : Mazloum V. Quelques notes sur l'histoire des pharmacopées et de leurs auteurs : The Chemist and Druggist, 25 juin 1927. Bull Société Hist Pharm. 1928;16(58):53-8.
- [3] : (La pharmacie au Grand siècle : image et rôle du pharmacien au travers de la littérature | Art & patrimoine pharmaceutique [Internet]. 2016 [cité 10 nov 2017]. Disponible sur: <http://artetpatrimoinepharmaceutique.fr/Publications/p63/La-pharmacie-au-Grandsiecle-image-et-role-du-pharmacien-au-travers-de-la-litterature>).
- [4] : art. L. 5138-3 du CSP : Code de la santé publique.
- [5] : Agence du Médicament. Les Cahiers de l'Agence 3 - Médicaments à base de plantes, Paris, 1998.
- [6] : [16 mai 2017/ par Estelle B ] <https://www.sante-sur-le-net.com>.
- [7] : de la Charie, T. (2019). Se soigner par les huiles essentielles. Pourquoi et comment ça marche ? Editions du Rocher.
- [8] : Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Boti et al., 2006, Oussou et al., 2009. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils.
- [9] : (Salzer, 1977). The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings. A critical review. [1977].
- [10] : (Tomi et al. 1995). Composition and chemical polymorphism of the essential oils from
- [11]: tout savoir sur les huiles essentielles et aromathérapie [https:// www.passeportsante.net/portail/huiles-essentielles](https://www.passeportsante.net/portail/huiles-essentielles) .
- [12] : de la Charie, T. (2019). Se soigner par les huiles essentielles. Pourquoi et comment ça marche ? Editions du Rocher.
- [13] : <https://agronomie.info/fr/les-methodes-d'extraction-des-huiles-essentielles/>.
- [14] : (Silou *et al.* 2004) Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet.
- [15] : (Fackari *et al.* 2005) Les méthodes d'extraction des huiles essentielles
- [16]: (Lucchesi, 2005) Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes. Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles
- [17] : (Roldan- Gutiérrez *et al.*, 2008) Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction

- [18] : (Ferhat *et al.*, 2007) Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation
- [19]: (Bruneton,1999) Anti-proliferative, Cytotoxicity and Anti-oxidant Activity of *Juglans regia* Extract
- [20] : (Khajeh *et al.*, 2005) Comparison of essential oils compositions of *Nepetapersica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation methods
- [21] : (Kamran Khan *et al.*, 2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel
- [22] : HATTOU, Mohamed Amine 2016.Effets de l'incorporation des huiles essentielles extraites du thym et de l'origan sur la productivité, les qualités nutritionnelles et physicochimiques du poivron.
- [23] : (Passeport santé)
- [24] : Walker, H. G. ; Kohler, G. O. ; Garrett, W. N., 1982. Comparative feeding value of alfalfa press cake residues after mechanical extraction of protein. *J. Anim. Sci.*, 55 (3):498-504
- [25] : André, B. (1998). *Motiver pour enseigner*. Paris, France: Hachette.
- [26] : Favier A (2003) "Le stress oxydant." *L'Actualité chimique* Nov-déc: 108-115.. Wang H, X Shan, T Liu, Y Xie, B Wen, S Zhang, F Han and M Genuchten (2007b). "Le stress oxydant." *L'Actualité chimique* Nov-déc: 108-115. ;"Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots." *Planta* 225: 1483-1494.
- [27] : Pincemail J, Degrune F, Voussure S, et al.— Intake of fruits and vegetables in men and women aged 40 – 60 years from the ELAN study. Communication au 2nd Congrès International de Nutrition, Dijon, France, 2007.4
- [28] : (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2002 ; De Moffarts *et al.*, 2005
- [29] : Sevanian A, Davies K.J, Hochstein P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med.* 1985;1(2):117–24. [PubMed] Valko M, Leibfritz D, Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84. [PubMed]
- [30]-[31] : Babulka , 2004 : phytothérapie. Edition .Assosiation pour promotion phytothérapie médicale,2. Pp :56 -59
- [33]-[32] : *L'Encyclopédie des plantes médicinales*, édition Larousse, 2001 et 2017.
- [34] : Vignoli Louise et Morel Marie-Claude ,1969. *Histoire de la pharmacie.*201,57 .pp :367-368

- [35] : (Couplan, F les plantes et leurs noms ; histoire insolites-édition : Quae .2012 .218 page)
- [36] : (Peter ; K.V. handbook of herbs and spice. Edition : wood bead publishing limited 2001, 325pages)
- [37] : Ali Abu-Rumman ; Naif Arab 2018 IJCS /Analysis of Pimpinella anisum (Yansoon) seeds using gas chromatography mass spectrometry; 6(5): 3033-3037
- [38] : **Référence Tela Botanica (France métro [1]) : Pimpinella anisum [2] (fr)**
- [39] : [avogel.ch/fr/encyclopaedie-plantes/pimpinella\\_anisum.php](http://avogel.ch/fr/encyclopaedie-plantes/pimpinella_anisum.php)
- [40] : L[41]Ali Abu-Rumman ; Naif Arab 2018 IJCS /Analysis of Pimpinella anisum (Yansoon) seeds using gas chromatography mass spectrometry; 6(5): 3033-3037
- [41] : [avogel.ch/fr/encyclopaedie-plantes/pimpinella\\_anisum.php](http://avogel.ch/fr/encyclopaedie-plantes/pimpinella_anisum.php)
- [43] : 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.
- [44]- [44] : Ozguven M., 2012. Aniseed. In: Handbook of Herbs and Spices: Volume 2. Woodhead Publishing Limited, 138–150.
- [47-48-49-46] : Singh G., Kapoor I., Singh P., Heluani C. & Catalan C., 2008. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and oleoresins from anise seeds (Pimpinella anisum L.). Int. J. Essent. Oil Ther. 2(September), 122–130.
- [51-52-53-55] : Ghouati Y., Belaiche T., Ouhssine M., Amechrouq A., Tahiri A. & Chakir S., 2012. Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de fruits d’anis vert marocain (\*). Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 151(1–4), 25–34.
- [54] : Souri E., Amin G., Farsam H. & Barazandeh Tehrani M., 2008. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. DARU J. Pharm. Sci. 16(2), 83–87
- [55-56] : Wenli Sun , Mohamad Hesam Shahrajabian & Qi Cheng | (2019) Anise (Pimpinella anisum L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes, Cogent Biology, 5:1, 1673688,
- [58-59-60-61-62-63-64-57] : Mlle BEKARA AMINA.évaluation de l’effet thérapeutique de l’extrait aqueux d’anis vert (Pimpinella anisum L) chez les jeunes rats exposés à l’acétate de plomb pendant la gestation et la lactation : étude neurocomportementale et évaluation de statut oxydatif.univ oran 1 science et technologie e Jardin potager, le compagnonnage
- [65] : étude ethnique phytochimique et évaluation de l’activité antibactérienne des fruits de Pimpinella anisum de diverses zones de culture au MAROC; M.ajebli et M.eddouks 2017

**[66]:** 2 Etude phytochimique et évaluation de différentes activités des extraits de *Pimpinella anisum*, LEMJALLAD Lamiaa ,2015, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques ;a fes tunisie . 2

**[67] :**PilarPrieto, ManuelPineda, MiguelAguilar :Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E

**[68] :** Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Natre*, 4617 (181): 1119-1200.

**[69] :** *Analytical Biochemistry* 269, 337–341 (1999)

Article ID abio.1999.4019, available online at <http://www.idealibrary.com> on

**[A] :** Shakya AK, Sharma N, Saxena M, Shrivastava S, Shukla S. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of Majoon-e-Dabeed-ul-ward against carbon tetrachloride induced liver injury. *Experimental Toxicology and Pathology*. 2012; 64(7-8):767-73.

**[B] :** Xu, L., He, J., Kaiser, A., Gräber, N., Schläger, L., Ritze, Y., Scholz, H. (2017). Correction: A Single Pair of Serotonergic Neurons Counteracts Serotonergic Inhibition of Ethanol Attraction in *Drosophila*. *PLoS ONE* 12(3): **e0174010**.

**[C] :** Nicolai et *al.*, 2016: Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Xerostomia and trismus (Part 2). Literature review and consensus statement

**[D] :**(Baba et Malik, 2015) : Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemon*

# Annexe

## Annexe 1 :

### ➤ Pharmacopée européenne :

la Pharmacopée Européenne est un ouvrage de référence unique en matière de contrôle qualité des médicaments au sein des pays signataires de la Convention relative à son élaboration.

Les normes officielles qui y sont publiées fournissent une base juridique et scientifique au contrôle de la qualité pendant les processus de développement, de production et de commercialisation.

Elles concernent la composition qualitative et quantitative et les essais à effectuer sur les médicaments, sur les matières premières utilisées dans leur production et sur les intermédiaires de synthèse. Tous les producteurs de médicaments et/ou de substances à usage pharmaceutique doivent donc appliquer ces normes de qualité pour pouvoir commercialiser leurs produits dans les États signataires de la Convention.

### ➤ Cadre juridique

Les textes juridiques suivants rendent obligatoire la Pharmacopée Européenne :

- la **Convention** relative à l'élaboration d'une **Pharmacopée européenne**, élaborée par le Conseil de l'Europe,
- un **protocole** adopté en 1994 qui modifie la Convention en vue de l'adhésion de l'Union européenne et définit les pouvoirs respectifs de l'Union européenne et de ses États membres au sein de la **Commission européenne de Pharmacopée**,
- les Directives européennes 2001/82/CE et 2001/83/CE (telles qu'amendées) relatives aux médicaments à usage humain et vétérinaire. Ces textes maintiennent le caractère obligatoire des **monographies de la Pharmacopée Européenne** lors d'une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les parties contractantes de la Convention s'engagent à :

- élaborer progressivement une pharmacopée qui sera commune aux pays intéressés et qui s'intitulera « **Pharmacopée Européenne** »,
- prendre les mesures nécessaires pour que les monographies deviennent les normes officielles applicables sur leurs territoires respectifs, via une mise en application directe ou indirecte (après traduction dans leur langue officielle) dans leur législation nationale.

Pour plus d'informations sur les procédures de travail et les fonctions des différents organes chargés de l'exécution des travaux d'élaboration de la **Pharmacopée européenne**, veuillez consulter les documents dans le menu ci-contre.

### ➤ Mission

Le rôle de la Pharmacopée Européenne est de participer à la protection de la santé publique par le biais de l'élaboration de spécifications communes reconnues relatives à la qualité du médicament et de ses composants. Ces spécifications doivent être appropriées puisqu'elles constituent, pour le patient, l'une des garanties fondamentales en matière de sécurité d'emploi.\*

## **Annexe 2 :**

### **ANSM :**

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Agence qui vise à garantir la sécurité des patients lors de l'utilisation des médicaments et des produits de santé. L'ANSM évalue, contrôle et inspecte les médicaments, les cosmétiques, etc., de leur fabrication à leur commercialisation : l'agence donne l'autorisation de vendre des médicaments, surveille tous les événements indésirables ou inattendus liés à l'utilisation des produits de santé, effectue des contrôles en laboratoire et inspecte régulièrement les sites de fabrication et de recherche. L'ANSM s'est substituée à l'Afssaps, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, le 1er mai 2012.

## **Annexe 3 :**

### **L'AFNOR/ISO**

Créée en 1926, AFNOR est une association régie par la loi de 1901, composée de près de 2 500 entreprises adhérentes. Sa mission est d'animer et de coordonner le processus d'élaboration des normes et de promouvoir leur application.

Reconnue par les pouvoirs publics - qui ont confié au Ministère chargé de l'industrie un rôle de coordination interministérielle et de contrôle - AFNOR est le noyau central du système français de normalisation. Rassemblant autour d'elle tous les grands acteurs socio-économiques, elle est à l'écoute de leurs besoins et collabore étroitement avec les 25 bureaux de normalisation et autres instances professionnelles. Elle développe une collection de normes répondant à leurs objectifs stratégiques.

Société de service, AFNOR a développé, pour les entreprises en particulier, une gamme de prestations qui - de la diffusion des normes à la certification en passant par la formation - permet de façon concrète l'insertion de la norme dans le développement des entreprises.

AFNOR a individualisé au sein de filiales ses activités commerciales et concurrentielles avec la création d'AFNOR Certification et d'AFNOR Compétences dans le domaine de la formation

des médicaments. En outre, leur existence facilite la libre circulation des médicaments au sein de l'Europe et au-delà.

Les monographies et autres textes de la Pharmacopée Européenne sont élaborés de façon à répondre aux besoins :

- des autorités réglementaires,
- des services chargés du contrôle qualité des médicaments et de leurs constituants,
- des fabricants de médicaments et de leurs différents composants.

La Pharmacopée Européenne est largement utilisée à l'échelle internationale. La mondialisation et l'expansion du commerce international dans le domaine du médicament ayant renforcé la nécessité de développer des normes de qualité de portée mondiale, la Commission travaille en collaboration étroite avec tous les utilisateurs de la Pharmacopée à travers le monde.

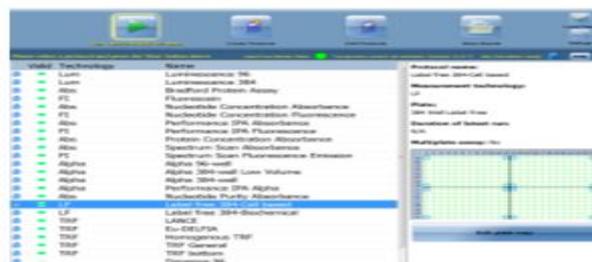
#### **Annexe 4 :**

##### **Description du lecteur de microplaque PerkinElmer :**

Le lecteur de microplaque EnSpire de PerkinElmer est une Platform très accessible à la recherche pour la détection quantitative de l'émission et/ou l'absorbance de la lumière. Le lecteur inclut plusieurs technologies de mesure: La technologie filtre absorbant (F-Abs), quad-monochromateur en fonction de l'intensité de fluorescence (FI) (lecture de dessus et ci-dessous), luminescence (Lum), Alpha technologie, Temps fluorescence résolu (TRF) et la technologie sans étiquette (LF : Label Free technology). Il utilise différents modes de mesure telle que le monopoint, sur la volée, cinétique, le spectre de balayage, ... etc., tout dépend de la technologie utilisée. Ainsi, La lecture mono-point à mouvement mécanique extrêmement rapide et précis permet la lecture des plaques de jusqu'à 384 puits et le balayage du spectre flexible permet des mesures d'absorption et d'émission des spectres



Son logiciel Enspire est facile à utiliser et offre une vue claire de toutes les informations pertinentes sur l'écran. Par souci de fiabilité et de commodité, tous les protocoles et les résultats sont stockés dans une base de données. De plus, Il possède un explorateur de protocole à accès rapide. Des exemples de protocoles sont inclus en tant que point de départ afin de permettre aux utilisateurs de rétablir leur propre protocole spécifique à leur utilisation. Le logiciel est une application 32 bits fonctionnant sous Windows® Vista ou Windows® 7.



Les fichiers de résultats sont stockés dans un fichier .csv compatible Microsoft Excel® ou un fichier graphique format .mht. Les fichiers peuvent également être imprimés ou exportés dans un support.

