

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Technologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème

***Etude phytochimiques et biologiques d'huile
essentielle des graines de fenouil (Foeniculum
vulgare L)***

Présenté par : *Melle : Touami Amel* & *Melle : Bourkaib Samah*

Jury :

- ✓ Président : Mr D. ADDAD
- ✓ Examineur : Mme C. MESLI

Encadrant : Mr B. MEKHANEG

**Année Universitaire
2022 – 2023**

Remerciement

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadrant Mr **B. MEKHANEG** qui nous dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury Mr **D. ADDAD** et M^{me} **C. MESLI** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous remercions encore les ingénieures de laboratoire de microbiologie de Saidal et Mr **TADJER** de CRAPC.*

*On remercie aussi l'ensemble du personnel, les responsables du laboratoire de Génie des procédés, chimie et laboratoire d'analyse Mr. **CHAOUCHI** pour leur aide et leurs conseils qui nous ont facilité le travail.*

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des Sciences de la Technologie pendant les cinq années de notre parcours.

Amel & Samah

Dédicace

*D'abord, je remercie **mon Dieu** qui m'a donné ce succès, qui m'a guidé et aidé tout au long du cheminement académique, ces phrases ne suffisent jamais les faveurs de Mon dieu juste pour dire : الحمد لله*

Mes parents pour leur sacrifice, leurs multiples soutiens, et pour leur affection quotidienne, merci d'être présents dans toutes circonstances. Je pris le tout puissant de

Vous donnez une longue vie et de représenter votre fierté.

*A mes chères frères et sœurs que j'adore énormément : **Hichem, Mohamed, Amira et Wissam.***

*A mes chers neveux et nièces : **Abderahim et Noursine.***

*A ma sœur qui la vie m'a donnée... **Yassmine.***

*À mon soutien dans la vie... **Mohammed et sa famille.***

*A ma chère amie et binôme **Samah.***





Dédicace

*Avant tout nous remercions **ALLAH**, le tout puissant qui nous a donné, la patience et la santé durant toutes les années de nos études et surtout en accomplissant ce modeste travail*

***Mes parents** pour leur sacrifice, leurs multiples soutiens, et pour leur affection quotidienne, merci d'être présents dans toutes circonstances. Je pris le tout puissant de*

Vous donnez une longue vie et de représenter votre fierté.

*A mes chères frères que j'adore énormément : **Abdelbassit, Ahmed et Mohamed***

*A mes chers belles sœurs : **Rahma et Amira***

*A mes chers nièces : **Tawba et Ania***

*A mes chères cousines : **Khouloud et Marwa***

*A mon meilleur : **Mohamed***

*A mes fidèles amies : qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragé, : **AYA, Imane, Achwak, Nour el houda, Kawther** et avec elles j'ai passé des années inoubliables.*

*A ma chère amie et binôme **Amel** l'exemple de diligence et d'effort, Ce fut un grand plaisir de travailler avec elle, qui m'a partagé la plupart des temps des études et des souvenirs. En fin, à tous ceux qui m'aime*

SAMAH

ملخص

نبات الشمر هو جزء من عائلة Apiaceae الموزعة على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط. إنه نبات طبي عطري معروف على نطاق واسع بخصائصه البيولوجية المتعددة والتي ترجع بشكل أساسي إلى ثرائه في المستقلبات الثانوية مثل البوليفينول والزيوت الأساسية.

يهدف العمل الحالي إلى دراسة الكيمياء النباتية والنشاط البيولوجي للزيوت العطرية من الشمر. كشفت GPC عن وجود أربعة مكونات أساسية ، **52.04%** estragol ، **33.18%** trans anethole ، ليمونين **6.75%** و fenchone **2.84%** ، تم تأكيد هذه المكونات بواسطة GC/MS. أتاح توصيف زيت الشمر تحديد مجموعات وظيفية معينة مثل (=C-H و C=O و Amide C-O-C و C-OH). يحتوي الزيت العطري لبذور الشمر على نشاط مثير للاهتمام كمضاد للبكتيريا على سلالات بكتيرية معينة ممرضة ، فهي تظهر نسبة 25% من MIC لـ *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Candida albicans*. على النقيض من *staphylococcus epidermidis*، الإشريكية القولونية والسامونيلا تيفيموريوم ، فإن لهما نسبة 50%. يكشف FRX عن ثلاثة عناصر معدنية رئيسية هي الكربون والأكسجين والبوتاسيوم ، بالإضافة إلى ذلك ، فإن الزيوت العطرية من الشمر لها نشاط مضاد للأكسدة مقبول (46.75 ميكروغرام / مل) مقارنة بحمض الأسكوربيك (19.73 ميكروغرام / مل). من ناحية أخرى ، تم استخلاص البوليفينول والفلافونويد والعفص باستخدام مذيبات مختلفة: الإيثانول والهكسان والكلوروفورم والإيثيل الإيثيلي.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للأكسدة ، شمر ، زيوت عطرية ، البوليفينول.

Résumé

Foeniculum vulgare fait partie de la famille des apiaceae largement répandues dans le bassin méditerranéen. C'est une plante aromatique médicinale largement connue par ses multiples propriétés biologiques qui sont principalement dues à sa richesse en métabolites secondaires comme des polyphénols et des huiles essentielles.

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique et l'activité biologique des huiles essentielles de fenouil. La CPG a révélé la présence de quatre composantes essentielles, estragol **52.04 %**, trans anethol **33.18%**, limonene **6.75%** et fenchone **2.84 %**, ces composantes sont confirmés par GC/MS. La caractérisation des huiles de fenouil ont permis d'identifier certains groupements fonctionnels tel que (=C-H, C=O, Amide, C-O-C et C-OH).

L'HE des graines de fenouil ont une activité antibactérienne intéressante sur certaines souches bactériennes pathogènes, elles montrent une CMI de 25% pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. En revanche *staphylococcus epidermidis* *Escherichia coli* et *Samonella typhimurium*, ont une CMI de 50%. La FRX, révèle trois éléments minéraux principaux carbone, oxygène, et potassium

Par ailleurs, les HE de fenouil présente une activité antioxydante acceptable (46.75 µg /ml) par rapport à l'acide ascorbique (19.73 µg /ml.).

D'autre part, les polyphénols, flavonoïdes et les tanins, ont été extraits en utilisant différents solvants : éthanol, Hexane, chloroforme et Ether éthylique

Mots clés : Activité antibactérienne, Activité antioxydante, Fenouil, Huiles essentielles, Polyphénols.

Summary

Foeniculum vulgare is a member of the Apiaceae family, widely distributed in the Mediterranean basin. It is an aromatic medicinal plant widely known for its multiple biological properties, which are mainly due to its richness in secondary metabolites such as polyphenols and essential oils. The aim of the present work is to study the phytochemistry and biological activity of fennel essential oils. GPC revealed the presence of four essential components, estragol 52.04 %, trans anethol 33.18%, limonene 6.75% and fenchone 2.84 %, confirmed by GC/MS. Characterization of fennel oils identified functional groups such as (=C-H, C=O, Amide, C-O-C and C-OH). Fennel seed EO has an interesting antibacterial activity on certain pathogenic bacterial strains, showing a MIC of 25% for *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, on the other hand, have a MIC of 50%. FRX reveals three main mineral elements: carbon, oxygen and potassium. In addition, fennel EO showed acceptable antioxidant activity (46.75 µg /ml) compared to ascorbic acid (19.73 µg /ml.). In addition, polyphenols, flavonoids and tannins were extracted using different solvents: ethanol, hexane, chloroform and ethyl ether.

Key words: Antibacterial activity, Antioxidant activity, Fennel, Essential oils, polyphenols.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations et symboles

Résumé

Introduction générale..... Error! Bookmark not defined.

Chapitre I : Etude phytochimique des grains de Fenouil (*Foeniculum vulgare*) 3

I.1. Présentation de la plante 3

I.1.1. Historique..... 3

I.1.2 Généralité sur le fenouil..... 3

I.1.3. Description botanique 4

I.1.4. Classification taxonomique de fenouil..... 4

I.1.5. Origine et répartition géographique 4

I.1.6. L'utilisation de fenouil..... 5

I.1.6.1. Utilisations culinaires..... 5

I.1.6.2. Usage traditionnelle 5

I.1.6.3. Utilisation thérapeutique 5

I.1.6.4. Utilisation en pharmacologie 6

I.1.7. Composition phytochimique du fenouil..... 6

I.1.7.1. Huile essentielle 7

I.1.7.1.1. Localisation..... 7

I.1.7.1.2. Composition chimique 7

I.2. Les Métabolites Secondaires..... 7

I.2.1. Classification des métabolites secondaires 7

I.2.1.1. Les terpénoïdes 8

I.2.1.2. Les composés phénoliques..... 8

I.2.1.3. Flavonoïdes 9

I.2.1.3.1 Source de flavonoïdes 10

I.2.1.4. Tanins..... 10

Chapitre II : Méthodes d'extractions des huiles essentielles..... 12

II.1 Historique 12

II.2 Définition d'huile essentielle 12

II.3 Biosynthèse et Composition chimique 13

II.4 Caractéristiques et propriétés physiques..... 13

II.5 Intérêts thérapeutiques	14
II.6 Les méthodes d'extraction	14
II.6.1. Hydrodistillation	14
II.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau	15
II.6.3 Hydrodistillation assistée par ultrasons	16
II.6.4 L'enfleurage.....	16
II.6.5 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes	17
II.6.6 L'expression à froid.....	18
II.6.7 Extraction aux gaz supercritiques	18
II.6.8 Extraction par solvants volatils.....	19
II.6.8.1 L'appareil de soxhlet	19
Chapitre III. Activités biologiques des huiles essentielles	21
III.1. L'activité antibactérienne	21
III.1.1 Introduction	21
III.1.2 Activité antibactérienne.....	21
III.1.3 Mode d'action des huiles essentielles	22
III.1.4. Méthode détermination de l'activité antibactérien	23
III.1.4.1. Méthode d'aromatogramme	23
III.1.4.2. Méthode de micro-atmosphère.....	24
III.2. Activité antioxydante	25
III.2.1. Généralités sur les antioxydants	25
III.2.2. Caractéristiques des antioxydants	25
III.2.3. Principaux antioxydants et leurs caractéristiques.....	25
Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	29
IV.1. Matériel végétal.....	29
IV .2. Détermination du taux d'humidité	30
IV .3. Extraction des huiles essentielles de fenouil par hydrodistillation	30
II.3.1. Caractérisation de l'huile essentielle extraite	32
II.3.1.1. Caractéristiques organoleptiques	32
II.3.1.2. Détermination des propriétés physico-chimiques.....	32
IV.3.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles de fenouil	36
IV.3.2.1. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	36
IV.3.2.2. Couplage d'un chromatographe en phase gazeuse à un spectromètre de masse (GC/MS).....	39

IV.3.2.3. Analyse par Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	41
IV.3.3. Analyse par spectrométrie à fluorescence X.....	42
IV.3.4. L'activité antibactérienne des huiles essentielles de fenouil par la méthode d'aromatogramme	43
IV.3.4.1. Choix des souches bactériennes des milieux de culture	43
IV.3.4.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	44
IV.3.4.3. Préparation des dilutions d'huile de fenouil	44
IV.3.5. L'activité antioxydante d'huile de fenouil par la méthode de réduction de DPPH*	44
IV.4. Extraction des polyphénols	47
II.4.1. Dosage des composés phénoliques, flavonoïdiques et tannins.....	49
II.4.1.1. Dosage des phénols totaux	49
II.4.1.2. Dosage des tannins totaux	50
II.4.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux	50
Chapitre V. Résultats et discussions	52
V.1. Détermination du taux d'humidité	52
V.2. Extraction des huiles essentielles	52
V.2.1. Caractères organoleptiques.....	53
V.2.2. Caractéristiques physiques	53
V.2.3. Caractères chimiques.....	54
V.2.4. Analyse chromatographique des huiles essentielles de fenouil.....	55
V.2.4.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	55
V.2.4.2 Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par GC/MS	56
V.2.4.3 La spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	58
V.2.5. Analyse chimique par la fluorescence X.....	60
V.2.5. L'activité antibactérienne d'huile de fenouil par la méthode d'aromatogramme	61
V.2.6. L'activité antioxydante d'huile de fenouil par la méthode de réduction de DPPH*	66
V.3. Extraction des polyphénols de <i>Foeniculum vulgare L</i>	68
V.3.1. Dosage des composés phénoliques, flavonoïdiques et tannins	69
V.3.1.1 Dosage des phénols totaux	69
V.3.1.2 Dosage des tannins totaux	71
V.3.1.3 Dosage des flavonoïdes totaux	72
Conclusion générale	74

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Figures

Figure I.1 le fenouil sauvage.	3
Figure II 1: Appareil de Clevenger.	15
Figure II 2: principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	16
Figure II 3: Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD).....	17
Figure II 4: Montage d'expression à Froid	18
Figure II 5: Photographie et schéma de l'installation d'extraction supercritique	19
Figure II 6: Appareil de soxhlet	20
Figure III 1 : principaux sites d'action des huiles essentielles	23
Figure III 2: Principe de la méthode de diffusion par disque	24
Figure III 3: Principe de la méthode de micro-atmosphère	24
Figure III 4: Additifs antioxydants les plus utilisées	26
Figure IV 1: les graines de fenouil.	29
Figure IV 2: Montage d'hydrodistillation (Clevenger).....	31
Figure IV 3: L'huile essentielle de fenouil.....	32
Figure IV 4: pH mètre	Error! Bookmark not defined.
Figure IV 5: Réfractomètre.	34
Figure IV 6: Le montage GC/ MS.....	39
Figure IV 7: Appareil de FTIR de type SHIMADZU 8400.	41
Figure IV 8: Principe de fonctionnement de la fluorescence X	42
Figure IV 9: les différentes dilutions d'HE de fenouil.....	45
Figure IV 10: les différentes dilutions de vitamine C	46
Figure IV 11: Extraction des concrètes par soxhlet.	48
Figure IV 12:élimination du solvant par le rotavapeur	49
Figure V 1: Taux d'humidité des graines de fenouil.	52
Figure V 2: spectre FTIR pour HE des graines de fenouil.....	59
Figure V 3: Histogramme des diamètres des zones d'inhibition (mm) en fonction de la concentration ((100%), (75%), (50%), (25%)).....	62

Figure V 4 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur Bacillus subtilis.	63
Figure V 5: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur Candida albicans.	63
Figure V 6: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur E.coli.	64
Figure V 7: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur Samonella Typhimurium.....	64
Figure V 8: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur Staphylococcus aureus.	65
Figure V 9: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur Pseudomonas aeruginosa.....	65
Figure V 10: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'HE des graines de fenouil.	67
Figure V 11: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.....	68
Figure V 12: histogramme du rendement de l'extraction.	69
Figure V 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	70
Figure V 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine.	71
Figure V 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	72

Liste des Tableaux

Tableau I. 2: classification du fenouil	4
Tableau I. 3: Classification des terpénoïdes	8
Tableau I.4: Les principales classes de composés phénoliques	9
Tableau I.5: Quelques sources naturelles de flavonoïdes.	10
Tableau III 1: Description de quelques tests antioxydants in vitro chimiques	28
Tableau IV 1 : Conditions opératoires des analyses par CPG des huiles essentielles de fenouil	38
Tableau IV 2: Conditions opératoires des analyses par GC/MS des huiles essentielles de fenouil.....	40
Tableau IV 3: Liste et caractéristiques des microorganismes testés.	43
Tableau V 1: Les caractères organoleptiques de l'HE des graines de fenouil.	53
Tableau V 2: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle des graines de Fenouil.....	53
Tableau V 3: Les indices chimiques d'HE des graines de Fenouil étudiées.....	54
Tableau V 4: Principaux Composés en % de l'huile essentielle des graines de Fenouil.	56
Tableau V 5: Composition chimique de l'huile essentielle des graines de foeniculu vulgare L.	57
Tableau V 6: Caractérisation HE des graines de fenouil par spectroscopie FTIR.	60
Tableau V 7 : Principaux minéraux en % de la poudre des graines de Fenouil.....	61
Tableau V 8: les diamètres d'inhibition des souches bactériennes.	62
Tableau V 9: Variation du pourcentage l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'HE des graines de fenouil.	66
Tableau V 10: Variation d'absorbance et du pourcentage l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.	67
Tableau V 11: Rendement d'extraction des extraits de Foeniculu vulgare L	69
Tableau V 12: Résultats du dosage des polyphénols.	70
Tableau V 13: Résultats du dosage des tannins.	71
Tableau V 14 : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux	72

Liste des abréviations et symboles

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

GC-MS : chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CPG : Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse

DMSO : Diméthyle Sulfoxide

DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl

E.coli : Escherichia coli

F. vulgare : *Foeniculum vulgare*

FTIR : Infra-Rouge à Transformation de Fourier

UV : Ultra Violet

G+ : Gram positif

G- : Gram négatif

H % : Taux d'humidité exprimé en pourcentage

HCl : Acide chlorhydrique

H.E : Huile essentielle

Ia : L'indice d'acide

IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50%

Ie : L'indice d'ester

Ir : Indices de réfraction

Is : L'indice de saponification

KOH : Hydroxyde de potassium

MH : Milieu Mueller Hilton

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

R_{HE} : Rendement

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

µg: microgramme

% : Pourcentage

°C : Température en degrés Celsius

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes avec leur grande importance pour l'homme, confèrent à ce dernier des vertus qu'il ne peut pas s'en passer, dont l'entretien de la vie sur Terre par la photosynthèse, c'est une source de nourriture, elles fournissent des matériaux de construction, des produits à base de papier et les combustibles en plus de leur utilisation comme des médicaments et comme additifs pour les produits alimentaires pour diverses raisons.

A l'heure actuelle encore, la science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits dont les domaines d'application sont très variés tels que l'industrie alimentaire comme additifs, les cosmétiques, les parfumeries et les industries de savon et de détergents. Elles rentrent également dans la composition de plusieurs médicaments. Leur utilisation s'appelle « l'aromathérapie », qui consiste à utiliser les huiles essentielles dans diverses manifestations pathologiques [1].

Les végétaux contiennent divers métabolites dont les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Ces derniers jouent un rôle dans la protection de la plante contre les agressions d'agents pathogènes. Ils sont classés selon plusieurs groupes, dont les trois principaux sont les alcaloïdes, les terpénoïdes ainsi que les polyphénols [2].

Ce mémoire s'intéresse à une famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence* en forme d'ombelles* et qui est aujourd'hui nommée Apiacées. Certaines plantes de cette famille sont en particulier utilisées lors de troubles digestifs de type dyspepsies*, météorisme*, ballonnements et douleurs intestinales ; il s'agit de l'aneth (*Anethum graveolens L.*), l'angélique (*Angelica archangelica L.*), l'anis (*Pimpinella anisum L.*), le carvi (*Carum carvi L.*), la coriandre (*Coriandrum sativum L.*), le cumin (*Cuminum cyminum L.*) et le fenouil (*Foeniculum vulgare Mill.*) [3].

Le fenouil (*Foeniculum vulgare*) originaire de la méditerranée est considéré comme une plante aromatique et médicinale. Elle est utilisée comme aromates dans les préparations culinaires, servant principalement comme correcteur de goût dans l'industrie agro-alimentaire (confiseries, pains, ...). En médecine traditionnelle, le fenouil est très utilisé pour ses effets carminatifs, sédatifs, apéritifs, stomachiques, antispasmodiques, etc... [4].

Dans la continuité de l'axe de recherche relatif à la valorisation du potentiel aromatique et médicinal des plantes nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique des H.Es des graines de fenouil [5].

L'objectif de notre étude est d'évaluer les paramètres physico-chimiques d'huile essentielle de fenouil extrais par hydro-distillation et d'identifier leurs principaux constituants

Introduction générale

chimiques par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'évaluation de leurs activités antimicrobiennes et anti-oxydantes. Outre la préparation d'extraits dans quatre solvants (éthanol, hexane, éther éthylique et chloroforme) et l'étude leur teneur en polyphénols, tannins et flavonoïdes totaux.

Notre travail présente dans ce manuscrit est réparti en deux parties : partie bibliographique et partie expérimentale.

La première partie est scindée en trois chapitres :

- ✓ Le premier est réservé à l'étude bibliographique de la plante de *foeniculu vulgare L*
- ✓ Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes d'extraction des huiles essentielles.
- ✓ Le troisième chapitre traite l'étude de l'activité biologique des huiles essentielles.

La deuxième partie est divisée en deux chapitres :

- ✓ Le premier chapitre illustre le matériel et méthodes
- ✓ Le deuxième chapitre résultats et interprétations

A la fin on termine par une conclusion générale avec les perspectives souhaitables.

*Chapitre I : Etude phytochimique
des grains de Fenouil (Foeniculum
vulgare)*

Chapitre I : Etude phytochimique des grains de Fenouil (*Foeniculum vulgare*)

I.1. Présentation de la plante

I.1.1. Historique

Le fenouil est une herbe avec une grande histoire d'utilisations médicinale et culinaire. Le nom de *Foeniculum* a été donné à cette plante par les Romains, il dérivé du mot latin *foenum*, c'est-à-dire herbe [6].

Foeniculum vulgare a un rôle médicinal et économique important en raison de l'utilisation fréquente des différentes parties de la plante. Cependant, les graines de fenouil sont les plus exploitées notamment dans les préparations culinaires et les industries agro-alimentaires [7].

I.1.2 Généralité sur le fenouil

Fenouil (*Foeniculum vulgare*) est une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des ombellifères (Apiaceae), connu et utilisé par les humains depuis l'Antiquité. Il a été cultivé dans tous les pays entourant la mer Méditerranée en raison de sa saveur. Le regain d'intérêt dans le produit naturel plutôt que des agents synthétiques a de nouveau attiré l'attention sur les plantes comme source de composés aromatiques [8].



Figure I.1 le fenouil sauvage.

I.1.3. Description botanique

Le fenouil est une plante bisannuelle à tiges dressées, ramifiées pouvant atteindre 2 m de hauteur. Ses Feuilles très divisées sont en lanières filiformes. Les supérieures réduites dépourvues d'involucres et d'involucelles ne comportent que quelques lanières. Ses fleurs petites et jaunes sont disposées en ombelles de 6-20 rayons sans involucres avec une corolle à 5 pétales et 5 étamines [1].

Les graines de fenouil sont variées infiniment en longueur, largeur, goût et d'autres caractères. En général, ils ont une forme presque cylindrique avec une base arrondie et un sommet plus étroit couronnés avec un grand stylopode. Ce sont généralement de 3-12mm de longueur et de 3 à 4mm de largeur [6].

I.1.4. Classification taxonomique de fenouil

Tableau I. 1: classification du fenouil [9]

Règne	Plantae
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	Foeniculum
Espèce	Vulgare
Nom botanique	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill

I.1.5. Origine et répartition géographique

Le fenouil est une ancienne herbe saisonnière. La plante de fenouil est originaire de la région sud de la Méditerranée et, par naturalisation et culture, elle pousse à l'état sauvage dans les hémisphères nord, est et ouest, en particulier en Asie, en Amérique du Nord et en Europe. Il est cultivé dans les champs et pousse aussi à l'état sauvage. L'herbe était bien connue des

anciens Égyptiens, Romains, Indiens et Chinois. Les Romains le cultivaient pour ses graines aromatiques et les pousses charnues comestibles sont encore un légume très répandu dans le sud de l'Italie [9].

I.1.6. L'utilisation de fenouil

I.1.6.1. Utilisations culinaires

C'est une herbe très aromatique et savoureuse qui a des usages culinaires et médicinales. L'arôme des graines de fenouil est semblable à celui de l'anis. Utilisés comme arômes dans les produits de boulangerie, les plats de viande et de poisson la crème glacée, les boissons alcoolisées et les mélanges d'herbes. Le bulbe, le feuillage et les graines de la plante de fenouil sont largement utilisés dans de nombreuses traditions culinaires du monde.

La graine de fenouil séchée est une épice aromatique, anisée, de couleur brune ou verte lorsqu'elle est fraîche, et qui prend lentement une teinte grise à mesure que la graine gris terne au fur et à mesure que la graine vieillit. Pour la cuisson, les graines vertes sont les meilleures [10].

I.1.6.2. Usage traditionnelle

Le fenouil a été utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies depuis des milliers d'années en Asie de l'Est pays, l'Inde et la Chine. Les gens sont depuis longtemps familier avec la plante de fenouil. Au moyen âge les gens croyaient qu'il était important de mâcher les graines pour éliminer bruit abdominal [11].

Foeniculum vulgare a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'un certain nombre de maladies, par exemple, les douleurs antiémétique, apéritif, l'arthrite, le cancer, pour calmer les coliques de l'enfant et du nourrisson, la conjonctivite, la constipation, dépuratif, la diarrhée, tréma, emménagogue, fièvre, flatulence, gastralgies, la gastrite, l'insomnie, les douleurs du foie, ulcère de la bouche, et les maux d'estomac [9].

I.1.6.3. Utilisation thérapeutique

Foeniculum vulgare est une importante et bien connue, plante médicinale et aromatique avec effet carminative, digestive, galactogène et diurétique, indiquée dans le traitement des troubles respiratoires et gastro-intestinales [10].

I.1.6.4. Utilisation en pharmacologie

Foeniculum vulgare auprès des différentes activités pharmacologiques mentionnées dans la médecine traditionnelle. L'huile essentielle extraite des fruits de *F.vulgare* présente un effet antibactérien contre les agents pathogènes d'origine alimentaire, cytotoxiques, antiinflammatoire, antimicrobien, bronchodilatateur, oestrogénique, diététique, lithontripic, galactogogue, emménagogue, antithrombotique, hypotenseur, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, améliorant la mémoire, et les activités antimutagènes [10].

Les formes de préparation (forme galénique)

- Tisane de fenouil.
- Décoction de fenouil (racine).
- Gélule de fenouil.
- Teinture de fenouil.
- Extrait de fenouil en fluide [9].

I.1.7. Composition phytochimique du fenouil

F. vulgare est largement cultivé pour ses fruits comestibles (fenouil en forme de bulbe) ou pour ses graines. Le fenouil est l'un des légumes les plus importants avec une haute valeur nutritive due à sa richesse en potassium, sodium, phosphore et calcium. De plus, le fenouil est bien connu pour sa haute teneur niveaux de vitamines par rapport aux besoins humains. De plus, les graines de fenouil contiennent environ 7,27% de teneur en eau, 56,35% de glucides, 9,96% de lipides, 23,19% protéines, 10,50 % de cendres et 17,51 % de fibre [7].

Les fruits contiennent 10 à 12 % d'huile qui est stockée dans les cotylédons des graines. L'huile obtenue à partir du fruit du fenouil contient 4 % d'acide palmitique, 22 % d'acide oléique, 14 % d'acide linoléique et 6% d'acide pétrocylique. Le fruit a une valeur de 4 à 6% d'essence dont l'essence et les ingrédients combinés varient selon du lieu de croissance de la plante [11].

En plus des métabolites primaires, le fenouil est très riche en métabolites secondaires, notamment en composés phénoliques, hydrocarbures et composés volatils, extraits de différentes parties de la plante [7].

I.1.7.1. Huile essentielle

I.1.7.1.1. Localisation

Les huiles essentielles de fenouil sont principalement concentrées dans les méricarpes des graines. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des canaux sécréteurs [6].

I.1.7.1.2. Composition chimique

Le *F. vulgare* est bien connu pour son huile essentielle. L'odeur caractéristique, due à son huile essentielle, en fait un excellent agent aromatique dans les produits de boulangerie, les plats de la viande

Les principaux composants de l'huile essentielle des graines de *F. vulgare* sont le trans-anéthole, la fenchone, l'estragol (méthyl chavicol) et l' α -phellandrène. La composition de l'huile essentielle de *F. vulgare* présente une grande diversité chimique selon la méthode d'extraction et l'origine géographique [10].

I.2. Les Métabolites Secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires [12].

Cette appellation désigne une classe de composés organiques qui ne participent pas directement à la croissance, au développement et à la reproduction des plantes, d'où leur nom de "métabolites secondaires" [13].

I.2.1. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires dépassent 100000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales :

- Les terpénoïdes.
- Les composés phénoliques ou aromatiques.
- Les alcaloïdes [14].

I.2.1.1. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent la classe de métabolites secondaires la plus diversifiée sur le plan structural. Ils contiennent plus de 40 000 composés structurellement différents et forment la plus grande classe de plantes. Leur nom de terpène ou de terpénoïde a été utilisé pour la raison que leur premier membre a été isolé à partir l'huile de térébenthine. Il s'agissait de monoterpènes (C₁₀) découverts dans les années 1850 et sont considérés comme les unités de base à partir desquelles la nomenclature ultérieure est dérivée [13].

Tableau I. 2: Classification des terpénoïdes [14].

Nombre d'isoprène (n)	Formule brute	Classe
1	C₅H₈	Hémiterpène
2	(C₅H₈)₂	Monoterpène
3	(C₅H₈)₃	Sesquiterpène
4	(C₅H₈)₄	Diterpène
5	(C₅H₈)₅	Sesterpène
6	(C₅H₈)₆	Triterpène et stéroïde
8	(C₅H₈)₈	Tétraterpène
>8	(C₅H₈)_n	Polyterpène

I.2.1.2. Les composés phénoliques

Ces composés sont constitués d'au moins un cycle aromatique attaché à un ou plusieurs groupes hydroxyle. La structure chimique des phénols varie de phénols simples (c'est-à-dire les catéchols et les dérivés de l'acide hydrobenzoïque) aux mélanines de catéchol (C₆)₆ des polymères à longue chaîne ayant un poids moléculaire élevé, les tanins condensés (C₆-C₃-C₆)_n et les lignines (C₆-C₃)_n. Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆) et les stilbènes (C₆-C₂-C₆) ayant des poids moléculaires intermédiaires sont également des composés phénoliques [13].

Tableau I.3: Les principales classes de composés phénoliques [15].

Nombre d'atomes de carbone	Squelette carboné	Classe
6	C6	Phénols simples
7	C6-C1	Acides Hydroxybenzoïques
9	C6-C3	Acide hydroxycinnamiques Coumarines
10	C6-C4	Naphtoquinones
13	C6-C1-C6	Xanthones
14	C6-C2-C6	Stilbènes
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes
18	(C6-C3) ₂	Lignanes
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoïdes
N	(C6-C3) _n (C6-C3-C6) _n	Lignines Flavolanes (Tannins condensés)

I.2.1.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phytochimiques responsables des différentes couleurs des graines, des fleurs, des fruits, des feuilles et de l'écorce. Les flavonoïdes sont une grande classe de composés aromatiques naturels et sont signalés comme étant les phénols les plus communs des plantes. Les structures chimiques des flavonoïdes consistent en des cycles C6-C3-C6 qui correspondent à deux cycles aromatiques A et B liés par trois atomes de carbone, ce qui peut conduire à la formation d'un troisième cycle (C). Les variations de cette structure de base donnent les différentes sous-classes de composés flavonoïdes. Ce sont les flavanones, les isoflavones, les flavanols (catéchines), les chalcones, les flavonols et les anthocyanines [16].

I.2.1.3.1 Source de flavonoïdes

Tableau I.4: Quelques sources naturelles de flavonoïdes [17].

Flavonoïdes	Source
Flavonols	Endive, poireau, brocoli, radis, pamplemousse, thé noir ,Oignon, laitue, brocoli, canneberge, peau de pommes, olives, thé, vin rouge, Canneberge, raisin, vin rouge
Flavonols	Thé vert, noir Vin rouge
Flavones	Céleri, persil
Flavonones	Agrumes, jus de fruits, Zestes d'agrumes
Anthocyanes	Cerise, framboise, fraise, raisin , Coloration des fruits

I.2.1.4. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques des plantes qui leur confèrent une défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores) [18]. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux.

Les tanins sont abondants dans de nombreuses parties de la plante, y compris les fruits, cortex, feuilles, racines et autres parties. Dans l'alimentation humaine, les tanins sont présents dans boissons, légumineuses, certaines céréales, fruits et baies,herbes et condiments[19].

Du point de vue de la composition chimique, on distingue deux grandes familles de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [18].

- a- **Les tanins hydrolysables** : il s'agit d'oligo- ou de poly-esters de sucre, souvent le glucose avec des molécules d'acide-phénols. Ils seront alors classés selon la nature de l'acide-phénol en question : les tanins galliques seront dérivés de l'acide gallique alors que les tanins éllagiques seront dérivés de l'acide hexadroxyphénique.
- b- **Les tanins condensés** : ce sont des polymères flavaniques constitués d'unités flavan-3-ols. Ces molécules vont être liées entre elles par des liaisons C-C (type B) ou C-O (type A). Selon la

définition, les homo-polymères sont des tanins condensés présentant uniquement des flavan-3-ols alors que les hétéro-polymères présenteront des monomères de classes différentes [20].

*Chapitre II : Méthodes
d'extractions des huiles essentielles*

Chapitre II : Méthodes d'extractions des huiles essentielles

II.1 Historique

Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles sont reconnues pour leur valeur médicinale et sont des produits végétaux naturels très intéressants et puissants. Elles continuent à être d'une importance capitale jusqu'à nos jours. Les huiles essentielles sont utilisées comme parfums, arômes pour les aliments et les boissons, ou pour guérir le corps et l'esprit depuis des milliers d'années. Les découvertes de documents en Mésopotamie, en Chine, en Inde, en Perse et en Égypte ancienne montrent leurs utilisations pour de nombreux traitements sous diverses formes. Par exemple, dans l'Égypte ancienne, la population extrayait les huiles par infusion. Plus tard, les Grecs et les Romains ont utilisé la distillation et ont ainsi donné aux plantes aromatiques une valeur supplémentaire. Avec l'avènement de la civilisation islamique, les techniques d'extraction se sont encore affinées. A l'époque de la Renaissance, les Européens ont pris le relais et avec le développement de la science, la composition et la nature des huiles essentielles ont été bien établies et étudiées. De nos jours, les huiles essentielles de menthe poivrée, de lavande, de géranium, d'eucalyptus, de rose, de bergamote, de santal et de camomille sont les plus commercialisées [21].

II.2 Définition d'huile essentielle

L'huile essentielle ou essence végétale se définit comme étant un liquide hydrophobe des composés odoriférants, huileuses, incolores ou jaunâtres, inflammables, volatils secrété par une plante. Ce mélange complexe de diverses molécules (alcools, terpènes, cétones, etc....) est obtenu par distillation à la vapeur d'eau [22].

Les huiles essentielles sont issues de la sécrétion naturelle élaborée dans les différentes parties de la plante : la fleur, la feuille, le fruit, l'écorce....[23].

Selon l'AFNOR [24], les huiles essentielles sont définies comme étant des produits obtenus soit à partir de matières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. Ces essences sont des concentrés de molécules aromatiques, se trouvant dans certaines cellules sécrétrices des fleurs, des feuilles, des graines, des racines, ainsi que dans l'écorce ou le bois des arbres.

Ce mode d'extraction isole la partie volatile des plantes, odorante. Il s'agit d'un mélange de substances chimiques s'oxydant facilement ce qui implique la nécessité de conditions strictes

de stockage, car cette oxydation augmente le pouvoir allergénique d'un certain nombre de molécules présentes. Leur composition est variable en fonction de la partie concernée de la plante, mais aussi selon l'origine géographique des végétaux utilisés [25].

II.3 Biosynthèse et Composition chimique

Afin de comprendre comment les plantes fabriquent les huiles essentielles, il est probablement utile de prendre du recul par rapport au niveau moléculaire et de considérer les plantes comme des organismes vivants [26].

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc [27].

Il en résulte que la composition chimique d'une HE est assez complexe, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les tri terpènes (C30). Ces composés ont tous la même origine métabolique [28].

II.4 Caractéristiques et propriétés physiques

Les HE possèdent également des propriétés physiques communes : elles sont toutes insolubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques. En revanche, les HE se distinguent par d'autres critères bien spécifiques à chacune d'entre elles [29].

À température ambiante, elles sont liquides, rarement visqueuses (myrrhe, houblon). À plus faible température (10 °C), certaines cristallisent (rose, thym CT thujanol, fenouil) sans aucune altération chimique et indiquent une très bonne qualité de produit. Elles sont volatiles, ce qui explique leur caractère odorant et permet leur entraînement à la vapeur d'eau. Elles sont presque toujours plus légères que l'eau (densité < 1) et non miscibles à l'eau, ce qui permet leur séparation aisée dans l'essencier de manière totalement naturelle et spontanée. Elles sont actives sur la lumière polarisée et ont souvent un indice de réfraction élevé. Le pouvoir rotatoire et l'indice de réfraction sont deux constantes physiques caractéristiques de chaque huile

essentielle. Elles sont diversement colorées mais d'un jaune imperceptible pour la plupart des autres HE [30].

II.5 Intérêts thérapeutiques

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries. Les huiles essentielles sont également utilisées par massage, inhalation ou ingestion [31].

Aussi les huiles essentielles peuvent également être de simples excipients dans d'autres médicaments et servir par exemple d'arôme pour masquer le goût d'un principe actif, comme agent de pénétration percutanée ou encore comme source de précurseur d'hémisynthèse. C'est le cas des citrals qui servent à la production de la vitamine A [32].

Les huiles essentielles ont des effets psychophysiologiques, leurs utilisations permettant de réduire l'anxiété et de favoriser la sédation [33].

II.6 Les méthodes d'extraction

Les huiles contenues dans les cellules végétales sont libérées par la chaleur et la pression de diverses parties de la matière végétale, par exemple les feuilles, les fleurs, les fruits, l'herbe, les racines, le bois, l'écorce, les gommés et les fleurs. L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée par diverses méthodes, dont la distillation par hydrodistillation, la distillation à la vapeur d'eau sont les méthodes d'extraction les plus courantes. D'autres méthodes comprennent l'extraction par solvant, l'infusion aqueuse, le pressage à froid ou à chaud, l'effleurage [21].

II.6.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation, selon la méthode de la pharmacopée européenne, est réalisée dans un appareil de type Clevenger (figure II.1). Les végétaux (en poudre, ou grossièrement pulvérisés, ou découpés, à l'état frais ou flétris) sont introduits dans le ballon réacteur et immergés dans un bain d'eau, en présence de pierre ponce ou de billes de verre. Lors de la distillation, les vapeurs d'eau et d'huile essentielle se condensent dans le réfrigérant. L'hydrolat refroidi retourne dans le ballon. La distillation se fait en continu, à la pression atmosphérique.

Après l'arrêt du chauffage, puis refroidissement, le volume de l'huile essentielle récupérée est mesuré [23].

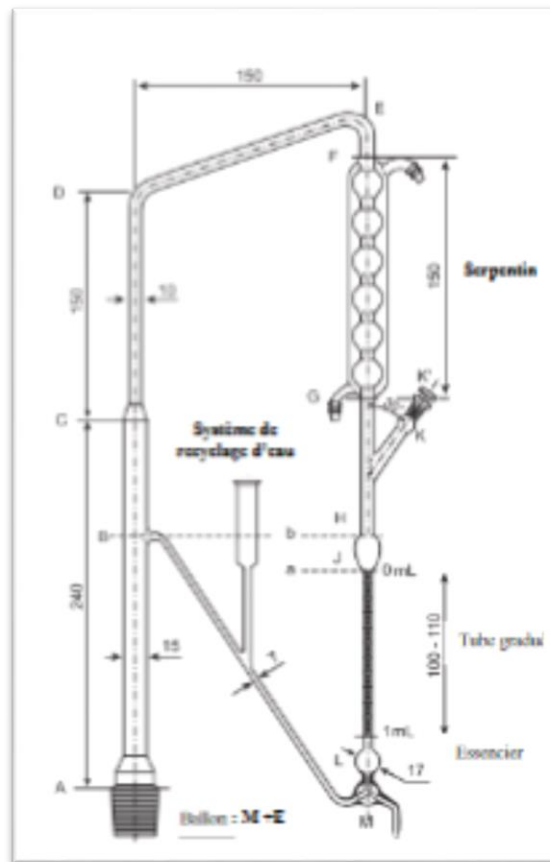


Figure II 1: Appareil de Clevenger [34].

II.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat et la distillation, régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters [36].

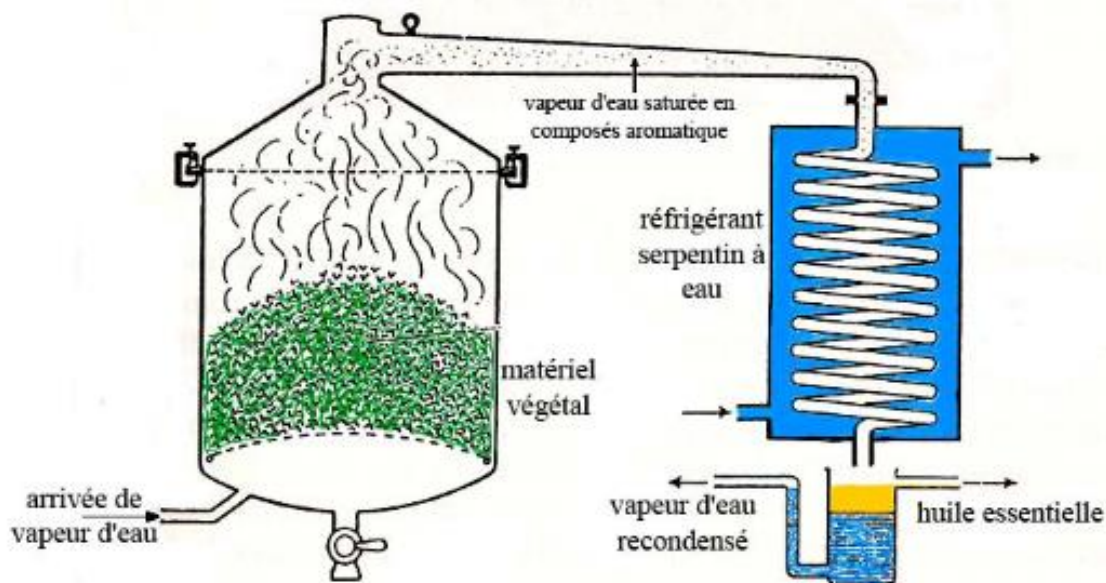


Figure II 2: principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau [37].

II.6.3 Hydrodistillation assistée par ultrasons

Dans ce cas, il s'agit d'un "pré" ou d'un "post" traitement de la plante. En effet, la structure des parois végétales et des tissus cellulaires est perturbée par l'effet des ondes ultrasonores et des micro-cavitations générées par les ultrasons. Ces modifications favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HE. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement [38].

II.6.4 L'enfleurage

La technique de l'enfleurage (macération à saturation) c'est une méthode plus guère utilisée, car elle est très compliquée sauf principalement pour les fleurs. Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques grasses qui absorberont tout le parfum. Les corps gras vont, ensuite, être épuisés par un solvant. Une fois l'arôme des fleurs absorbé, nous remettons des fleurs fraîches, et ceci jusqu'à saturation du corps gras. Au bout de 24 heures, le corps gras et les H.E sont séparés [39].

II.6.5 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

L'hydrodistillation sous pression réduite L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite, ou « VMHD : Vacuum Microwave HydroDistillation » (Fig II.3) Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal à traiter frais ou sec (auquel cas on lui rajoute une quantité d'eau requise) est soumis pendant un certain temps à des micro-ondes, dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis pendant un certain temps à un vide pulsé, qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. Les avantages présentés par cette technique sont nombreux tant au niveau économique qu'au niveau qualitatif [37].

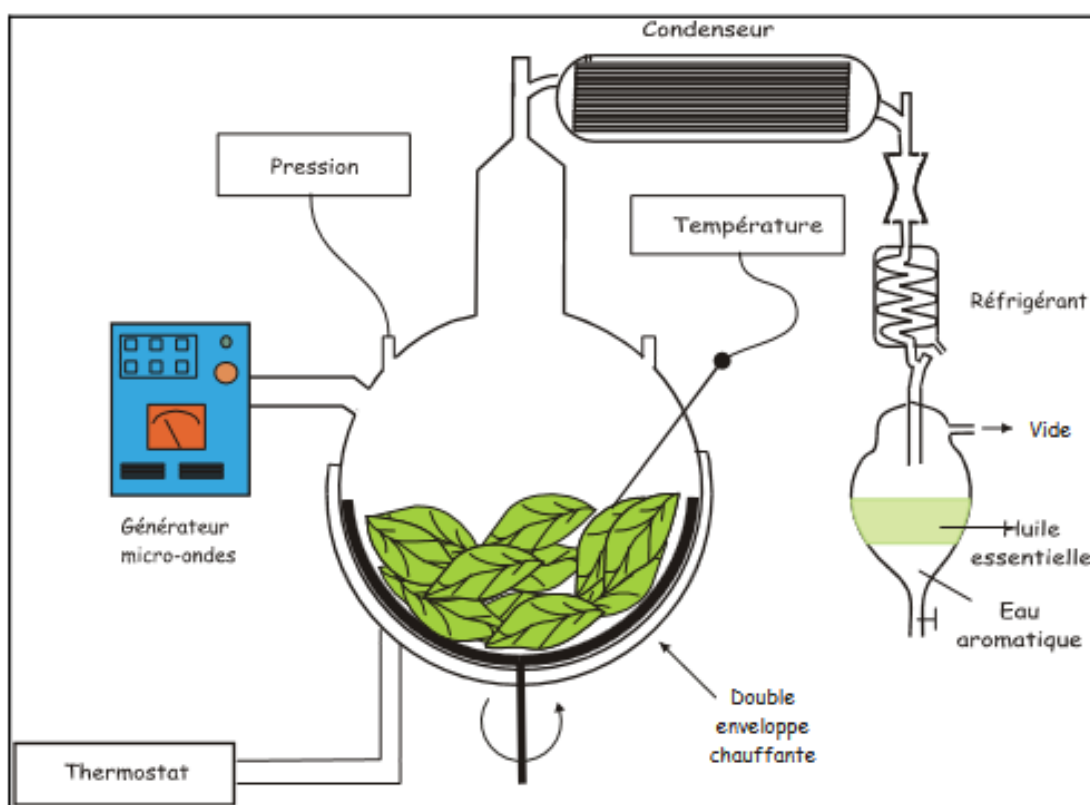


Figure II 3: Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD) [37].

Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite [38].

II.6.6 L'expression à froid

Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois. Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes car ce sont des produits fragiles de par leur composition en terpènes et aldéhydes [37].



Figure II 4: Montage d'expression à Froid [40].

II.6.7 Extraction aux gaz supercritiques

L'extraction par fluide supercritique est un procédé de séparation dans lequel les substances sont dissoutes dans un fluide qui est capable de modifier son pouvoir de dissolution dans des conditions spécifiques au-dessus de leur température (T_c) et de leur pression (P_c) critiques (région supercritique). Température (T_c) et leur pression (P_c) critiques.

Les fluides supercritiques possèdent les meilleures propriétés des liquides et des gaz : pouvoir de dissolution (capacité à pénétrer dans les micropores d'une structure solide) et propriétés de transport (bonne diffusion). Les propriétés d'un fluide supercritique sont utilisées pour extraire sélectivement un composé spécifique ou pour fractionner des mélanges en modifiant la température et la pression sans changement de phase [41].

Parmi les fluides supercritiques, le dioxyde de carbone est considéré comme le solvant qui à l'état supercritique, peut être considéré comme idéal. Le dioxyde de carbone supercritique présente des propriétés physico chimiques intermédiaires entre celles de la phase liquide et celles de la phase gazeuse.

Généralement le CO₂ supercritique permet de solubiliser des composés apolaires et de faibles masses moléculaires. Ensuite, la faible viscosité dynamique et la forte masse volumique résultent en une viscosité cinématique faible, qui favorise les phénomènes de convection naturelle massique. Ainsi, la viscosité, la masse volumique et un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au liquide, facilitent la pénétration du CO₂ supercritique dans des milieux poreux [38].

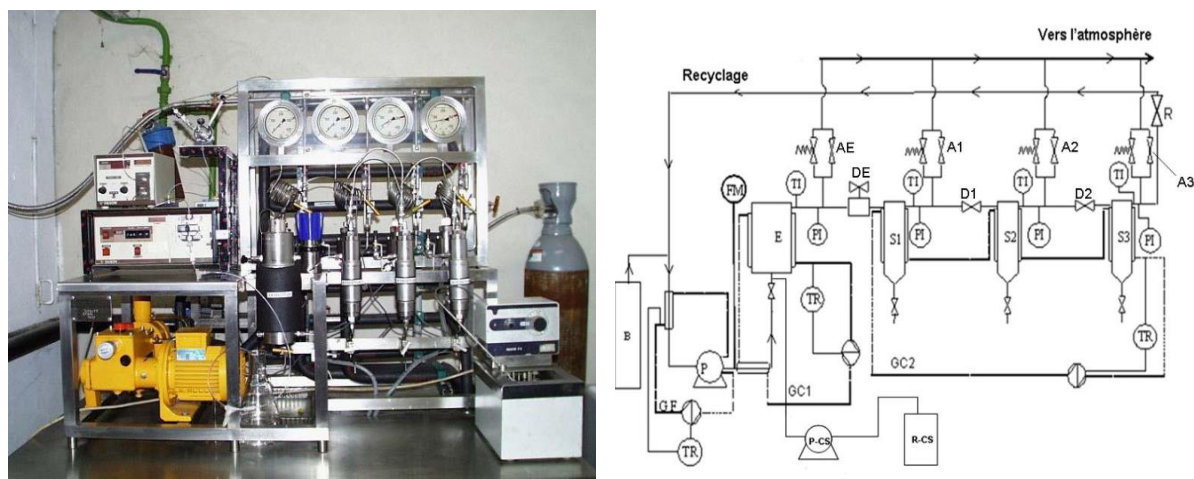


Figure II 5: Photographie et schéma de l'installation d'extraction supercritique [38].

II.6.8 Extraction par solvants volatils

Cette extraction consiste à épuiser le produit odorant par un solvant et à chasser ensuite ce même solvant, soit par concentration distillatoire, soit par précipitation. Ainsi écarte-t-on les hydrolats et les alcoolats qui sont obtenus par la distillation des extraits, les produits odorants venant avec le solvant. Après évaporation du solvant, on obtient des produits résineux, des pommades, des concrètes. Le premier solvant fut l'alcool éthylique, puis vint l'éther. Plus tard, on mit en œuvre le sulfure de carbone, le benzène, l'éther de pétrole, les solvants chlorés et fluorés [42]. Enfin, il convient de considérer le coût d'utilisation d'un solvant, soit son prix et celui de son recyclage, par conséquent le choix s'impose selon le type d'application

II.6.8.1 L'appareil de soxhlet

L'extraction à l'aide d'un appareil de type soxhlet (fig II.6) est une technique couramment utilisée pour isoler des composés actifs d'origine végétale sans les dégrader, il est constitué d'un ballon monocol, d'un réfrigérant et d'un extracteur. Ce dernier présente un système de tube permettant la vidange du réservoir dont le volume varie d'un modèle à l'autre.

Le système doit être complété à l'aide d'une cartouche en cellulose, placée dans le réservoir, destinée à recevoir le composé à extraire [43].

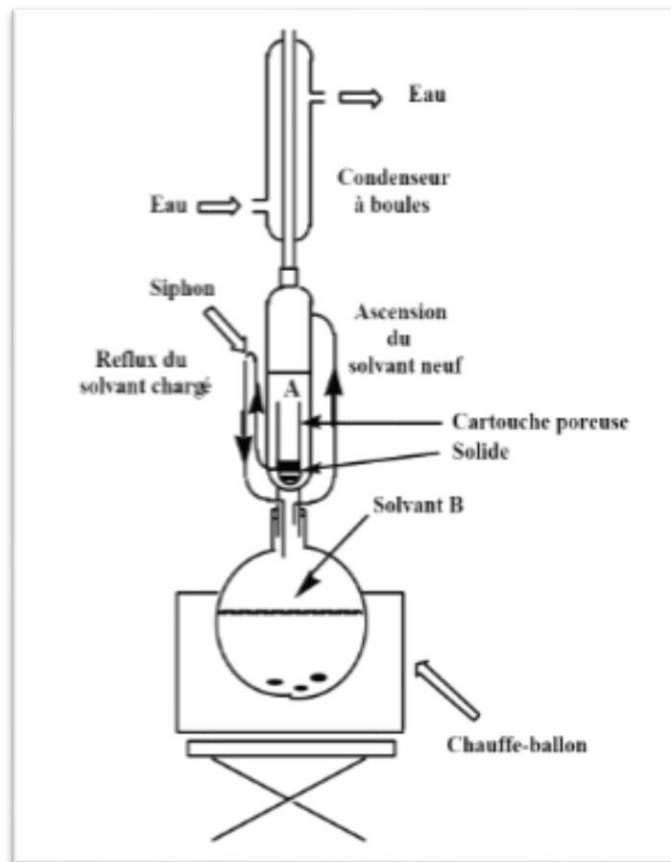


Figure II 6: Appareil de soxhlet [43].

*Chapitre III : Activités
biologiques des huiles essentielles*

Chapitre III. Activités biologiques des huiles essentielles

III.1. L'activité antibactérienne

III.1.1 Introduction

Ces dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de substances naturelles s'est accru et certaines questions concernant la sécurité des composés synthétiques ont encouragé des études plus détaillées des ressources végétales. Les huiles essentielles, produits odorants et volatils du métabolisme secondaire des plantes, ont une large application dans la médecine populaire, l'aromatisation et la conservation des aliments ainsi que dans les industries des parfums. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont connues depuis de nombreux siècles. Ces dernières années (1987-2001), un grand nombre d'huiles essentielles et de leurs constituants ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes contre certaines bactéries et champignons dans plus de 500 rapports [44].

Les HE vu la diversité des molécules qu'elles contiennent, sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. En effet, l'activité biologique d'une essence est à mettre en relation avec sa composition chimique et les effets synergiques possibles entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non pas seulement à ses composés majoritaires [45].

III.1.2 Activité antibactérienne

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques. Ces substances synthétiques ont été employées couramment [46].

L'utilisation des antibiotiques pour lutter contre des micro-organismes pathogènes est limitée en raison de leurs effets cancérogènes, leur toxicité aiguë et leur danger potentiel pour l'environnement en plus du problème de résistance bactérienne à cette classe thérapeutique. Plus récemment, la prévalence de la résistance aux antimicrobiens a incité les chercheurs à rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes pour inhiber les diverses bactéries pathogènes humaines. À cet égard, l'exploitation des huiles essentielles pour contrôler l'épidémie des bactéries pathogènes peut être utile pour lutter contre diverses maladies

infectieuses. L'impact antimicrobien des huiles essentielles et de leurs composants chimiques est démontré par plusieurs études [47].

III.1.3 Mode d'action des huiles essentielles

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives [47].

La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives permet aux molécules hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir à la fois sur la paroi cellulaire et dans le cytoplasme. Composés phénoliques, qui sont également présents dans l'Eos. La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives est plus complexe, ce qui permet aux bactéries Gram-négatives d'être plus résistantes aux HE et autres extraits naturels à activité antimicrobienne [48].

Les mécanismes d'action des Huiles Essentielles et/ou de leurs composants dépendent de leur composition chimique, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+) [49].

Le mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles n'est pas bien élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles essentielles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Fig III.1).

Parmi les mécanismes qui seraient mis en jeu, on cite :

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques.
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéine et peptidoglycanes).
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective et détérioration membranaire.
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique.
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne.
- Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion [50].

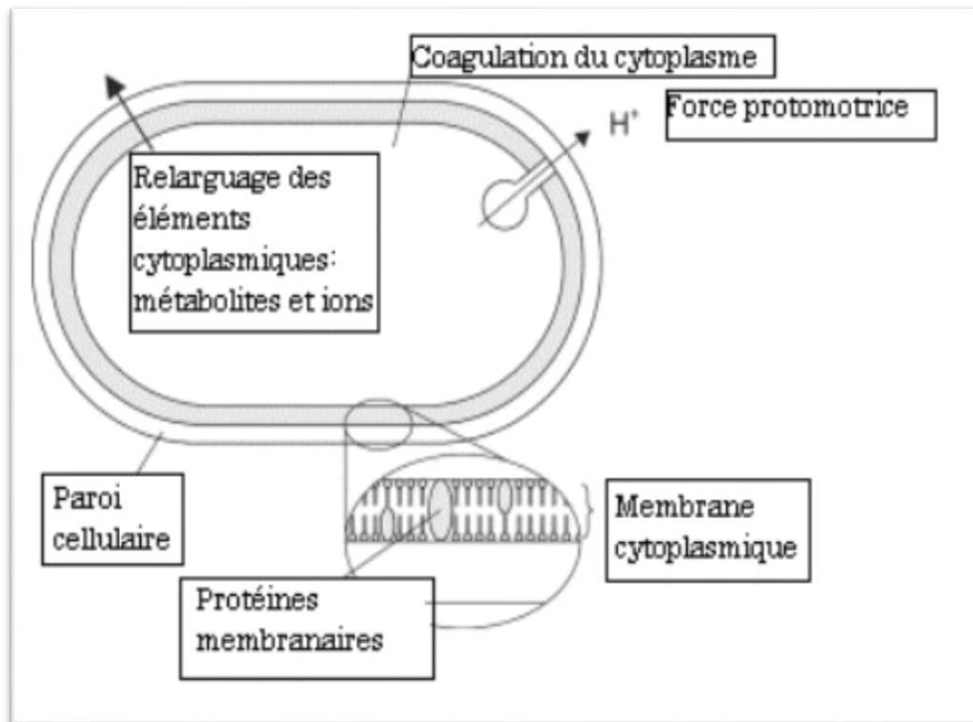


Figure III 1 : principaux sites d'action des huiles essentielles [50].

III.1.4. Méthode détermination de l'activité antibactérien

III.1.4.1. Méthode d'aromatogramme

Est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des HEs. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases : [51].

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

La technique de l'aromatogramme a été appliquée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de 6 mm de diamètre imprégné d'une quantité d'huile essentielle sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (figure III.2) [52].

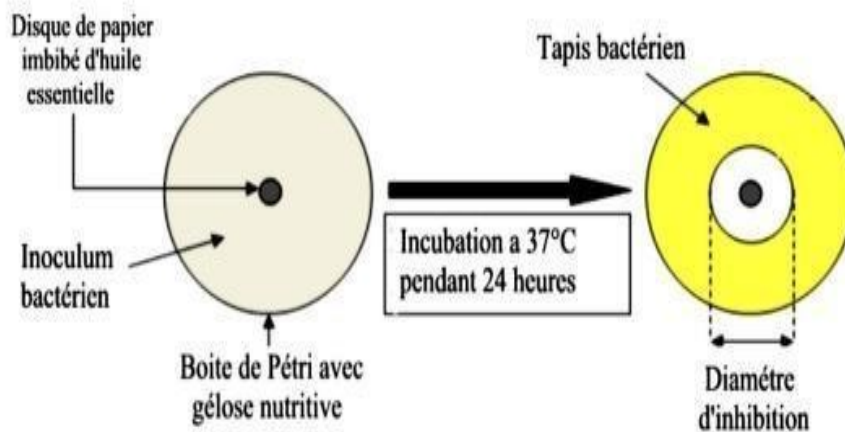


Figure III 2: Principe de la méthode de diffusion par disque [51].

III.1.4.2. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boites de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprègne d’huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boite de Pétri, renversée après fixation de l’huile essentielle sur le disque. Celui-ci n’est donc pas en contact avec le milieu gélose. L’huile s’évapore dans l’atmosphère de la boite, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés [53].

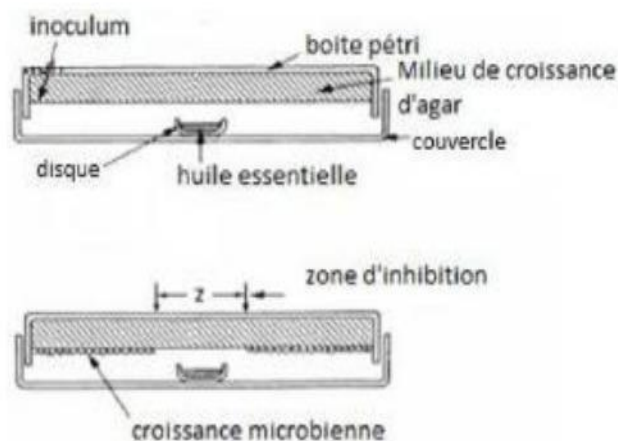


Figure III 3: Principe de la méthode de micro-atmosphère [53].

III.2. Activité antioxydante

III.2.1. Généralités sur les antioxydants

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent. Ce sont : l'oxygène singlet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical superoxyde O_2^- , les peroxyde alkyles $ROOH$ et les radicaux hydroxyles HO , peroxydes ROO et alkoxydes RO [54].

III.2.2. Caractéristiques des antioxydants

Un antioxydant se définit comme toute substance qui, lorsqu'elle est :

- Présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable.
- Retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat.

Lorsque les espèces réactives de l'oxygène sont générées *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Il s'agira principalement d'enzymes comme la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase, la catalase et aussi des molécules de faibles masses moléculaires telles que le tripeptide glutathion ou l'acide urique [55].

III.2.3. Principaux antioxydants et leurs caractéristiques

Il existe trois familles d'antioxydants : enzymatiques, moléculaires naturels et synthétiques. Pour cela, les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydantes classées en antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques. Parmi ces composés, les systèmes de défense enzymatiques sont reconnus comme étant les plus performants [56].

A/ Antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les plantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx). Le rôle majeur **du superoxyde dismutase ou SOD** est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. **La catalase**, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

L'activité du **glutathion peroxydase, ou GPx**, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur [57].

B/ Antioxydants de faible poids moléculaire

Les antioxydants de faible poids moléculaire (LMWA : low molecular weight antioxydant) sont capables de prévenir des dommages oxydatifs. Ils interviennent sur les molécules pro oxydantes de façon directe, en cédant leurs électrons aux radicaux libres, ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton.

Parmi les LMWA naturels les plus connus, on peut citer :

- La vitamine C ou acide ascorbique (AA)
- Les tocophérols (dont la Vitamine E)
- La vitamine A ou son précurseur le β -carotène
- Les thiols, les polyphénols, le zinc ou encore le sélénium
- Cofacteur de la glutathion peroxydase.

C/ Antioxydants synthétiques

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés.

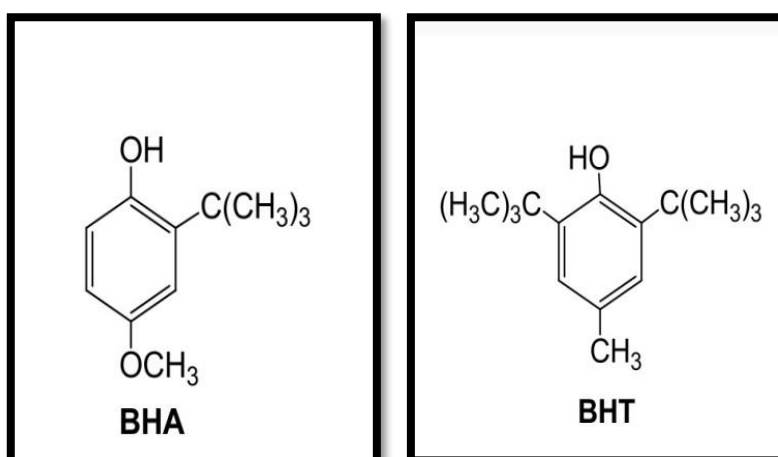


Figure III 4: Additifs antioxydants les plus utilisées [56].

III.2.3. Méthodes antioxydant In vitro

L'activité antioxydante des extraits de plantes a été évaluée par quelques tests antioxydants in vitro chimiques :

Tableau III 1: Description de quelques tests antioxydants in vitro chimiques [57].

Tests	DPPH	ABTS / TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes Réactionnels	•transfert d'électron majoritaire	•transfert d'électron et de proton	•transfert d'électron	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles	• hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox®	• CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox®	•en mg ou μmol équivalent Fe^{2+}	• CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox®
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> •très facile à mettre en œuvre • peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> • très facile à mettre en œuvre • cinétique de réaction très rapide • peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> • très facile à mettre en œuvre •peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> •facile à mettre en œuvre •couteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux ($\text{ROO}\cdot$)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires •interférences possibles à 515 nm •forte dépendance au pH et au solvant •radical inexistant in vivo 	<ul style="list-style-type: none"> • produits de dégradation antioxydants • radical inexistant in vivo 	<ul style="list-style-type: none"> •pH utilisé non physiologique •interférences possibles à 595 nm • interférences avec composés possédant $E^\circ < 0,77 \text{ V}$ 	<ul style="list-style-type: none"> • mécanismes de génération des ROO • non physiologique • interférences possibles des protéines

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Cette étude menée sur l'huile essentielle et les extraits des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare L*), vise à valoriser cette plante médicinale et aromatique. Les principaux objectifs de notre travail sont l'extraction des huiles essentielles et l'étude de l'activité antioxydante et biologiques des extraits des graines de fenouil.

Ce travail est réalisé au niveau des laboratoires :

- ✓ Génie des procédés Khemis -Miliana.
- ✓ Laboratoire biochimie « sciences de la nature et de la vie ».
- ✓ Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC), Tipaza.
- ✓ Laboratoire physico-chimique et biologique de complexe antibiotiques de Sidal – Médea.
- ✓ Laboratoire de technologie alimentaire (ENSA) –EL HARACH-

IV.1. Matériel végétal

L'échantillon utilisé dans notre extraction des huiles essentielles sont les graines de fenouil (*Foeniculum vulgare*), achetées au niveau de marché local (herboriste) originaire de la Syrie.



Figure IV 1: les graines de fenouil.

IV .2. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé en introduisant 10 g de graines broyées d'échantillon et positionnée dans une étuve réglée à $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La lecture des résultats ce fait, après avoir été refroidis à température ambiante.

$$\text{H\%} = [(M_f - M_s) / M_f] \times 100 \quad \text{IV.1}$$

Avec :

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M_f : masse de l'échantillon avant séchage (matière fraîche).

M_s : masse de l'échantillon après séchage (matière sèche).

IV .3. Extraction des huiles essentielles de fenouil par hydrodistillation**❖ Principe :**

L'extraction des huiles essentielles est faite à partir des graines, elle a été réalisée à l'aide d'un hydrodistillateur type Clevenger selon les recommandations de la pharmacopée européenne (2001). L'extraction d'huile essentielle de ces graines a été effectuée au laboratoire de génies des procédés à l'université de Djillali Bounaama de Khemis-Miliana.

❖ Mode opératoire :

- ✓ 50g des graines de fenouil sont mises dans un ballon à vide de 500ml, additionnées de 300ml d'eau distillée.
- ✓ L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur.
- ✓ Après 3 heures on récupère notre huile à cause de la différence de densité d'eau et de l'huile.

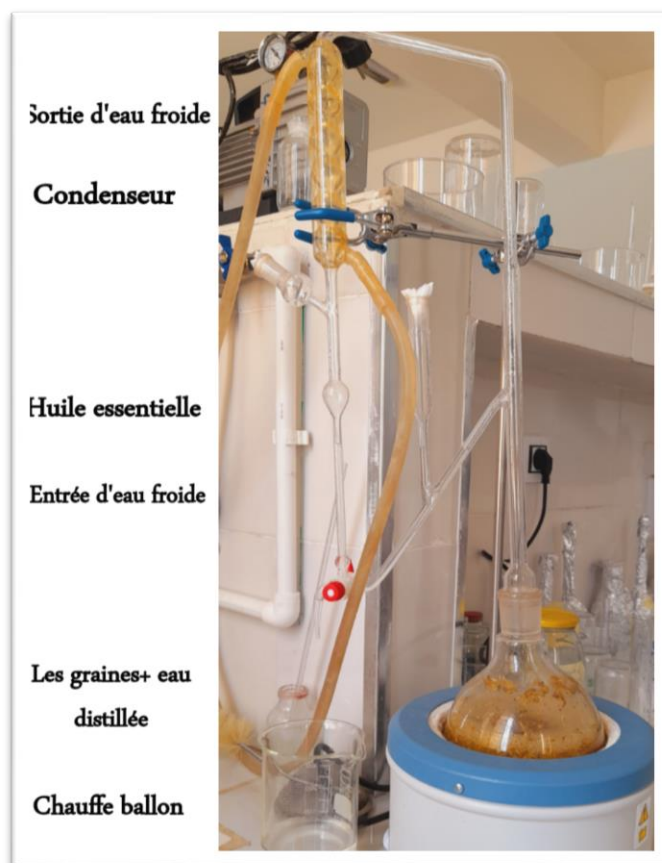


Figure IV 2: Montage d'hydrodistillation (Clevenger).

- **Conservation de l'huile essentielle de graines de fenouil**

La conservation des huiles essentielles est faite dans les conditions prédéfinies (précautions indispensables). C'est la raison pour laquelle la conservation de l'huile essentielle exigé à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

- **Détermination du rendement**

Selon la norme AFNOR (2000), le rendement en huile essentielle (R_{HE}), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE} = \frac{M'}{M} \cdot 100 \quad \text{IV.2}$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle des graines du fenouil.

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

M : masse des graines du fenouil utilisée en gramme et qui vaut 50 g.

II.3.1. Caractérisation de l'huile essentielle extraite

La caractérisation des huiles essentielles se fait à fin d'évaluer la qualité des extraits, on réalise une étude analytique, tout d'abord on détermine les caractéristiques organoleptiques, puis les propriétés physico-chimiques.

II.3.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) sont des indications qui permettent d'évaluer initialement la qualité d'une huile essentielle, La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.



Figure IV 3: L'huile essentielle de fenouil.

II.3.1.2. Détermination des propriétés physico-chimiques

Les H.Es sont caractérisées par leurs propriétés physiques (potentiel hydrogène, densité relative, indice de réfraction) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, indice de saponification, indice d'ester).

a. Potentiel hydrogène (pH)

Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH mètre.



Figure IV.4 : pH mètre.

b. La densité relative

La densité d'une huile essentielle, est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile à la masse d'un volume égal d'eau distillée à une température de 20°C [58].

- **Mode opératoire**

On pèse à l'aide d'un pycnomètre, des volumes égaux d'H.E et d'eau distillée : on pèse successivement le flacon vide, puis le flacon remplie d'eau distillée. Après essuyage, on le remplit avec l'HE et on note leurs poids exacts. La densité de l'huile essentielle est calculée par la formule II.3.

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \quad \text{IV.3}$$

Où :

d : densité,

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide,

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau,

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'huile essentielle

c. L'indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction des huiles essentielles a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre **figure II.4**.



Figure IV 5 : Réfractomètre.

Après nettoyage de l'appareil, on place 2 ou 3 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme. Puis on regarde dans l'oculaire et la mesure se fait en tournant les boutons de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule, finalement on note la valeur de l'indice et la température de mesure [59].

Une formule empirique permet d'évaluer l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C quand on l'a mesuré à une température légèrement différente :

$$I_{20} = I_{\theta} + 0.00045 * (\theta - 20^{\circ}\text{C}) \quad \text{IV.4}$$

Où :

I_{20} : Indice de réfraction à 20°C.

I_{θ} : Indice de réfraction à la température de mesure.

θ : Température de mesure.

0,00045 : Constant de variation de l'indice de réfraction quand la température varie de 1°C.

d. Détermination d'Indice d'acide

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse en mg nécessaire pour neutraliser son acidité libre. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger état de détérioration de l'huile essentielle.

❖ Principe :

L'indice d'acide des huiles essentielles revient à neutraliser les acides libres de celles-ci par l'hydroxyde de sodium (KOH).

❖ Mode opératoire :

- ✓ On introduit 0.5g de l'échantillon d'huile essentielle de fenouil dans l'erlenmeyer.
- ✓ On ajoute 12,5ml d'un mélange à volume égal d'éthanol à 96% et d'éther de pétrole.
- ✓ On met 0,5ml de solution de phénolphtaléine.
- ✓ On neutraliser la solution obtenue avec l'hydroxyde de sodium à l'aide de la burette.
- ✓ On titre et terminé lorsque la couleur rose persiste pendant au moins 15s. (Pharmacopée européenne (2000)).

En fin de titrage on lit le volume de NaOH consommé pour calcul l'indice d'acide à l'aide de la relation suivant :

$$I\alpha = \frac{5,611 \times (V_{eq} \times M) \times F}{m} \quad \text{IV.5}$$

V_{eq} : Volume équivalent de NaOH

N : Facteur de NaOH 0,99962

M_{NaOH} : Masse molaire de NaOH

m : la masse de HE (fenouil)

e. Détermination d'Indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre en milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile.

❖ Principe :

Hydrolyse des esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage de l'excès par une solution titrée d'acidechlorhydrique.

❖ Mode opératoire :

- ✓ On introduit 0.5 g d'huile de fenouil et 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) (0.5N) dans un ballon.

- ✓ On adapte un réfrigérant et On place le ballon dans un bain d'eau pendant 1h.
- ✓ On laisse refroidir puis on ajoute 20 ml d'eau distillé et 5 gouttes de l'indicateur coloré (phénol phtaléine).
- ✓ On titre la solution précédente avec la solution d'acide chlorhydrique (HCl) (0.5N).
- ✓ On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (en éliminant l'huile).

En fin de titrage lire le volume de KOH consommé pour la calculer de l'indice d'ester de la relation suivante :

$$I_e = [(28.05 \times (V_0 - V_1) \div m) - I_a] \quad \text{IV.6}$$

I_e : Indice d'ester

I_a : Indice d'acide

V_0 : Volume de HCl utilisé pour l'essai à blanc

V_1 : Volume de HCl

m : la masse de la prise d'essai

f. Détermination d'Indice de saponification

L'indice de Saponification IS est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'Hydroxyde de Potassium nécessaire à la neutralisation des Acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

Il est effectué après dosage de l'indice d'acide (I_a) et l'indice d'ester (I_e) selon la relation suivante :

$$I_e = I_s - I_a \quad \longrightarrow \quad I_s = I_e + I_a \quad \text{IV.7}$$

IV.3.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles de fenouil

IV.3.2.1. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

❖ Principe

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt [60]. La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés [61, 62]. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée

d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules [63,64].

❖ **Mode opératoire :**

L'HE de fenouil a été analysée par laboratoire de technologie alimentaire (ENSA) ou moyen d'un CPG Chrompack CP 9002 équipé d'une colonne capillaire Cp sil 8 CB de type polydiméthylsiloxane.

Tableau IV 1 : Conditions opératoires des analyses par CPG des huiles essentielles de fenouil.

Colonne capillaire	Cp sil 8 CB
Mode de détection	Impact électronique
Courant d'ionisation	70 Ev
Longueur	30 m
Diamètre interne	0.32 mm * 0.25 UM
Epaisseur de phase	0.25 µm du film
Température du détection (FID)	300° C
Gaz vecteur	Azote 1 ml/mn
Débit	1 ml/min
Pression en tete de colonne	10 ⁻⁷ mbar
Pression (source, analyseur)	10 ⁻⁷ mbar
Température d'interface	300°C
Température de l'injecteur	260°C
Programmation du four	De 50 °C à 250°C (2°C /mn)
Concentration des échantillons	Pur
Quantité injectée	1 µL
Mode d'injection	Split 1/100 (250°C)
Vitesse du papier (Intégrateur)	0.5 cm/mn

IV.3.2.2. Couplage d'un chromatographe en phase gazeuse à un spectromètre de masse (GC/MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Le but de combiner entre la GC-MS, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique [65]. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (I_r) et des données spectrales (spectre de masse) des constituants individualisée avec les caractéristiques de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [66].



Figure IV 4: Le montage GC/ MS.

Tableau IV 2: Conditions opératoires des analyses par GC/MS des huiles essentielles de fenouil.

Température d'injection	250°C
Mode d'injection	Split.1 ; 80
Volume injecté	0,2 µl
Type de colonne	HP-5MS
Dimensions	Long 30 m D int 0.25 mm Épaisseur film 0.25 µm
Phase stationnaire	5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)
Température du four	60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C., isotherme pendant 10 min..
Durée d'analyse	113 min
Gaz vecteur	Hélium pureté : N6.0 ; Débit GV : 0.6 ml/min
Détecteur de masse : Mode d'analyse	Scan TIC(de 30à 550)
Délai du solvant	3.5min
Température de l'interface	280 °c
Type d'ionisation	Impact électronique
Intensité du filament	70 év
Type de l'analyseur de masse	Quadripôles
Température de la source	230 °c
Equipement : Chromatographe	Hewlett Packard Agilent 6890 plus
Spectromètre de masse	Hewlett Packard Agilent 5973

IV.3.2.3. Analyse par Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

❖ Principe :

L'infrarouge est un rayonnement électromagnétique ; il possède toutes les propriétés fondamentales de la lumière : propagation, réflexion, réfraction, interférences, diffraction, diffusion, polarisation, etc. Il est situé dans une région spectrale invisible à l'œil humain, entre la lumière et les micro-ondes ; ses longueurs d'onde sont supérieures à celles des radiations rouges ($\lambda \geq 0,72 \mu\text{m}$) et on peut leur fixer une limite supérieure qui est voisine de 0,1 cm. Le domaine de l'infrarouge est divisé en infrarouge proche ($0,6 \mu\text{m} < \lambda < 2,5 \mu\text{m}$), en infrarouge moyen ($3 \mu\text{m} < \lambda < 25 \mu\text{m}$) et en infrarouge lointain (au-delà de 25 μm). Cette division très arbitraire est liée au développement des types de détecteurs utilisables et à la nature des matériaux utilisés.

La spectroscopie infrarouge renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères, par l'examen de la partie du spectre dite « des empreintes digitales » ou « fingerprint ». L'avènement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) autorisant une grande vitesse d'acquisition. Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infra-Rouge [67].

❖ Mode opératoire :

Quelques gouttes d'HE des graines de fenouil à été étalé entre deux plaques en verre, puis être analysées. L'analyse a été réalisée sur un appareil de type SHIMADZU 8400 ($400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$)



Figure IV 5: Appareil de FTIR de type SHIMADZU 8400.

IV.3.3. Analyse par spectrométrie à fluorescence X

C'est une méthode non destructive, qui exploite la fluorescence des éléments dans le domaine des rayons X, pour obtenir les renseignements quantitatifs sur la composition de l'échantillon.

❖ Principe

La spectrométrie de fluorescence X est une émission de rayons X, elle caractérise les éléments atomiques qui composent l'échantillon. L'énergie des photons X est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur. Lorsqu'un photon X rencontre un atome, il a donc une probabilité d'éjecter un électron de cœur par effet photoélectrique, l'atome est alors dans un état excité. La désexcitation se fait par une transition électronique : un électron d'un niveau plus élevé « descend » pour occuper la case quantique vide (place laissée vacante par l'électron éjecté). Cette transition électronique provoque l'émission d'un photon X. En analysant le spectre de rayons X émis par la matière, on peut en déduire la composition élémentaire de l'échantillon (concentrations massiques) et à partir d'étalonnage, il est possible de déterminer l'épaisseur de revêtements. La technique d'analyse comprend deux parties :

- ✓ Une source d'excitation : provoque l'émission d'un spectre de rayons X caractéristique de la composition de l'objet.
- ✓ Un détecteur est un analyseur de rayonnement : identifie les raies composant le spectre [68].

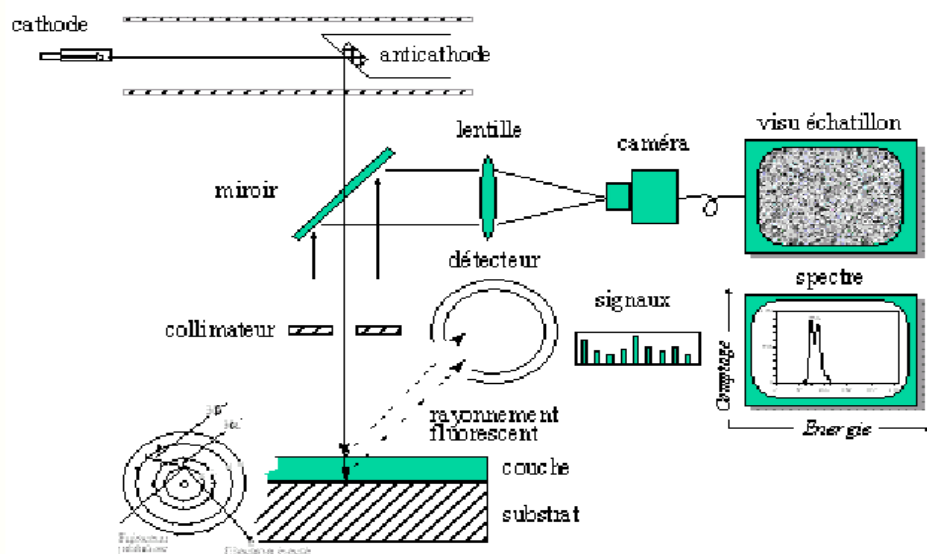


Figure IV 6: Principe de fonctionnement de la fluorescence X [68].

L'analyse chimique ont été réalisées au niveau de plateau technique de centre de recherche CRAPC à l'aide d'un spectromètre de Fluorescence des Rayons X « ZSX Primus II de Rigaku ».

IV.3.4. L'activité antibactérienne des huiles essentielles de fenouil par la méthode d'aromatogramme

❖ Principe :

L'activité antibactérienne est effectuée par dépôt d'un disque stérile de cellulose de 9 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité d'HE sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres.

IV.3.4.1. Choix des souches bactériennes des milieux de culture

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes. Deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et trois bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Samonella typhimurium*) et une levure (*Candida albicans*). Ces souches nous ont été fournies par le service de Microbiologie du complexe antibiotiques de Sidal –Médea-.

Tableau IV 3: Liste et caractéristiques des microorganismes testés.

Bactéries	N° ATTC	Gram	Milieu de culture	Famille
<i>Esherichia coli</i>	8739	–	Soja agar	<i>entrobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Soja agar	<i>staphylococcaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	10231	Levure	Sabouraud dextrose agar	<u><i>Saccharomycetaceae</i></u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	–	Soja agar	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Samonella typhimurium</i>	14028	–	Soja agar	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	Soja agar	<i>Bacillaceae</i>

IV.3.4.2. Préparation de la suspension bactérienne

Trois (3) à 4 colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile, et introduites dans un tube contenant de l'eau physiologique (NaCl) avec une bonne agitation et homogénéisation.

IV.3.4.3. Préparation des dilutions d'huile de fenouil

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle des graines du fenouil, nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) pour obtenir les concentrations suivantes : 100% (HE pur), 75% ,50% et 25%.

❖ Mode opératoire :

Le test est effectué en cultivant les bactéries sur un milieu Soja Agar et les levures sur Sabouraud dextrose agar. Chaque boîte de Pétri de 90 mm a reçu 20 mL du milieu de culture et estensemencée avec 1 à 2 µL de la suspension microbienne contenant $10^7 - 10^8$ cfu/mL. Mettrez 30 µL d'HE dans chaque disque stérile et sont déposés à la surface du milieu et laissés diffuser sur place pendant 30 min ; ensuite, ils ont été incubés, inversés à l'obscurité dans une étuve à une température de 37°C durant 24 h pour les bactéries et à 25°C durant 48 h pour la levure. La lecture des diamètres des zones d'inhibition après incubation est réalisée à l'aide d'un lecteur. Le test est répété trois fois.

IV.3.5. L'activité antioxydante d'huile de fenouil par la méthode de réduction de DPPH***❖ Principe :**

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH*) est un radical organique stable de couleur violet. En présence de composés anti radicalaire, le radical DPPH* est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance.

❖ Mode opératoire :

L'activité anti oxydante de l'huile essentielle des graines du fenouil a été mesurée par la méthode de réduction du DPPH*. Cent microlitres (50µl) de différentes dilutions d'huiles essentielles ont été mélangés avec 2ml de la solution d'éthanol de DPPH* dans des tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

Le contrôle négatif est composé de 50 μ l d'éthanol et de 2 ml de la solution de DPPH*. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

➤ **Préparation de la dilution éthanoïque de DPPH***

Solubiliser 2 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol et laisser à une température ambiante et à l'obscurité pendant 1h.

➤ **Préparation des dilutions de l'huile essentielle des graines du fenouil :**

On prépare des dilutions de l'huile essentielle des graines du fenouil comme suite :

- ✓ Peser 100 mg de l'huile essentielle des graines du fenouil par une balance analytique (précision de 0.0001g).
- ✓ Introduire ces 100mg dans un tube à essai (1) contenant 10 ml d'éthanol ($100 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$).
- ✓ Introduire 7.5 ml du tube (1) dans un tube (2) contenant 2.5 ml d'éthanol avec une concentration de $75 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.
- ✓ Introduire 6.6 ml du tube (2) dans un tube (3) contenant 3.4 ml d'éthanol avec une concentration de $50 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.
- ✓ Introduire 5 ml du tube (3) dans un tube (4) contenant 5 ml d'éthanol avec une concentration de $25 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.

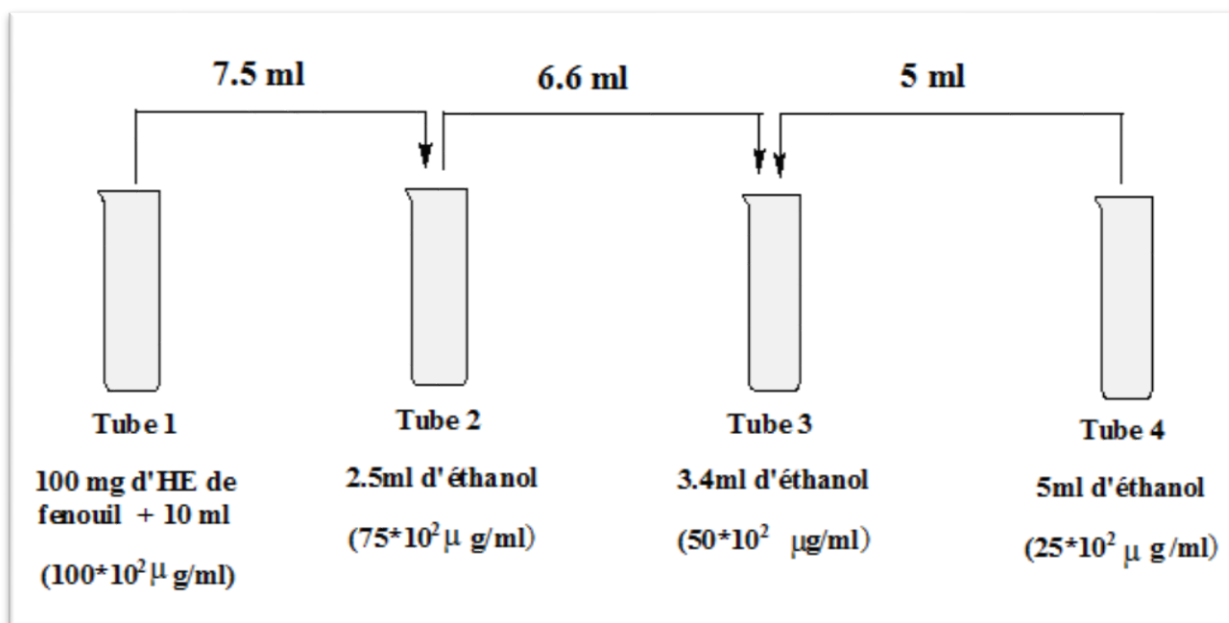


Figure IV 7: les différentes dilutions d'HE de fenouil.

- Préparation des dilutions de la vitamine C Les dilutions de la vitamine C (M. 176.13 ; 99,7%) :
- ✓ Peser 100 mg de vitamine C par une balance analytique (précision de 0.0001g).
 - ✓ Introduire ces 100mg dans un tube à essai (1) contenant 10 ml d'éthanol ($100 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$).
 - ✓ Introduire 7.5 ml du tube (1) dans un tube (2) contenant 2.5 ml d'éthanol avec une concentration de $75 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.
 - ✓ Introduire 6.6 ml du tube (2) dans un tube (3) contenant 3.4 ml d'éthanol avec une concentration de $50 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.
 - ✓ Introduire 5 ml du tube (3) dans un tube (4) contenant 5 ml d'éthanol avec une concentration de $25 \cdot 10^2 \mu\text{g/ml}$.

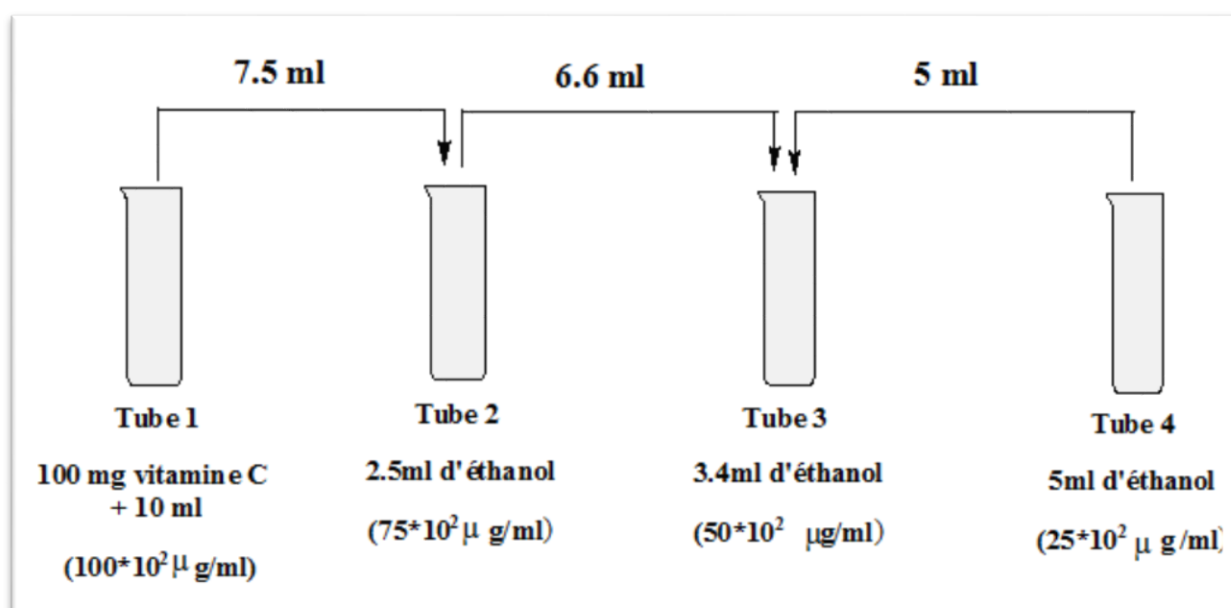


Figure IV 8: les différentes dilutions de vitamine C

Détermination du pourcentage d'inhibition

D'après Khodashenas l'inhibition du radical libre de DPPH* en pourcentage ($P_I\%$) est calculée selon la formule II.8 suivantes :

$$P_I = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100 \quad \text{II.8}$$

P_I : pourcentage d'inhibition (%).

A_{blanc} : Absorbance du blanc (DPPH* dans l'éthanol),

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du composé d'essai

Le pourcentage du DPPH* inhibé en fonction des concentrations en H.E et en vitamine C (Acide Ascorbique) a été tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC_{50} .

Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50%. La concentration effectrice (IC₅₀) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH* (concentration équivalente à 50% de DPPH* perdu). Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti radicalaire [69].

$$A = \frac{1}{IC_{50}} \quad \text{II.09}$$

A : Puissance anti radicalaire.

IC₅₀ : La concentration effectrice d'échantillon pour réduire 50% de DPPH*

IV.4. Extraction des polyphénols

Pour l'extraction on a utilisé le procédé qui est fréquemment utilisé : l'extraction par solvant volatil.

❖ Appareillage :

L'appareillage ayant servi à la réalisation des expériences (Soxhlet) comprend essentiellement trois parties (ballon, colonne, réfrigérant) :

- ✓ Le ballon sert à contenir le solvant pur au début de l'opération et c'est un récipient de récupération de l'extrait en fin de l'opération.
- ✓ La colonne joue le rôle d'extracteur, c'est dans celle-ci que se passe l'extraction proprement dite, par le contact matière végétale-solvant. Elle est composée de trois parties :

La première sert de support de la matière végétale, la deuxième et la troisième en deux tubes (1 et 2) qui servent respectivement de tube d'alimentation en solvant et vidange de l'extrait.

Le réfrigérant : situé en haut de la colonne, sert à condenser les vapeurs du solvant à cheminées par le tube 1.

❖ Mode opératoire :

➤ Préparation des échantillons :

Les échantillons sont préparés de la même façon que ceux utilisés dans l'extraction des huiles essentielles. L'échantillon végétal brut est pesé puis déposé dans une cartouche en papier filtre. On a effectué des extractions successives par différents solvants, de plus polaires au moins polaires : l'éthanol, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'hexane

L'extrait à l'hexane contient des composés apolaires, tandis que le chloroforme extrait les composés peu polaires et que l'acétate d'éthyle permet d'obtenir un extrait riche en composés

moyennement polaires. Le méthanol, solvant le plus polaire, extrait, quant à lui les composés les plus polaires

➤ **Extraction par Soxhlet :**

- ✓ Le solvant envisagé contenue dans le ballon est porté à sa température d'ébullition.
- ✓ Après un certain temps, il y a apparition des vapeurs qui montent dans le tube (1), correspondant au temps initial d'extraction initial ($t_0 = 0$).
- ✓ Ces vapeurs sont condensées et ne tomberont goutte à goutte sur la matière végétale.



Figure IV 9: Extraction des concrètes par soxhlet.

✓ **Élimination et Recyclage du Solvant Organique**

Le mélange chargé en extrait obtenue est soumis à une distillation par un rotavapeur. Ce traitement s'effectue à la température d'ébullition de chaque solvant, pendant une durée la plus courte que possible, afin d'éviter les dégradations thermiques éventuelles des composants volatils.

A l'issue de cette opération, on récupère d'une part la concrète et d'autre part le solvant organique, avec un rendement de récupération allant de 70 à 75% selon la nature de ce dernier.



Figure IV 10:élimination du solvant par le rotavapeur

II.4.1. Dosage des composés phénoliques, flavonoïdiques et tannins

II.4.1.1. Dosage des phénols totaux

• Principe

Le test Folin-Ciocalteu est la méthode la plus largement utilisée pour l'évaluation de la teneur en composés phénoliques totaux dans des extraits de plantes. Le réactif Folin-Ciocalteu consiste en un mélange oxydant d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui, une fois réduit, donne un chromophore bleu constitué d'un complexe phosphotungstique phosphomolybdène, où l'absorption maximale des chromophores dépend de la concentration des composés phénoliques. L'utilisation de la longueur d'onde de 760 nm, qui semblait être la mieux adaptée pour produire une absorption maximale du complexe phosphotungstique phosphomolybdène [70].

- **Mode opératoire**

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée avec le réactif Folin-Ciocalteu selon une méthode décrite par Singleton et Rossi [71]. 20 µl de l'échantillon a été mélangé à 100 µl de réactif Folin-Ciocalteu dilué fraîchement préparé (1:10v/v). Après 03 minutes, 300 µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7,5%) ont été ajoutés, le mélange a été agité réagi pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance a été lue à 765 nm et comparée à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-300 µg/mL)

II.4.1.2. Dosage des tannins totaux

- **Principe**

Un certain nombre de méthodes colorimétriques qui varient dans le degré de discrimination contre les composés phénoliques non tanniques, autres que les tannins, également présents dans le matériel végétal, ont été utilisées pour estimer les tannins. Les flavanols (tannins condensés, monomères, dimères, etc.), contrairement à la majorité des composés phénoliques naturels réagissent avec la vanilline en milieu acide pour donner un produit coloré à un maximum d'absorbance à 500 nm [71].

- **Mode opératoire**

La concentration totale en extrait de *Foeniculum vulgare* a été estimée en utilisant la méthode de la vanilline acidifiée [72]. 400 µl d'échantillon ont été ajoutés à 3 ml de solution de vanilline (4% dans l'éthanol) et à 1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 500 nm et comparée à une courbe d'étalonnage de catéchine (0-400 µg/ml).

II.4.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux

- **Principe**

La méthode au chlorure d'aluminium a été largement utilisée pour l'estimation de la teneur totale en flavonoïdes. Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à former un complexe stable avec des ions Al_3^+ dans une solution. La couleur du complexe dépend du rapport des ions

Al_3^+ sur les molécules de flavonoïdes et du motif des groupements hydroxyles (OH) de ces dernières. Pour cette raison, les lectures spectrophotométriques utilisées dans cette méthode peuvent varier de 367 à 510 nm dans différentes procédures expérimentales [73].

- **Mode opératoire**

La concentration en flavonoïdes totaux a été estimée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium [73], avec une légère modification. 1ml d'une solution d'éthanol AlCl_3 à 2% a été ajouté à 1 ml d'extrait. Le mélange réactionnel incube pendant 10 minutes à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 430 nm et comparée à une courbe d'étalonnage de quercétine (0-40 $\mu\text{g/mL}$).

*Chapitre V : Résultats et
discussions*

Chapitre V. Résultats et discussions

Ce chapitre est consacré à l'étude phytochimique et biologique de l'extrait et de l'huile essentielle des graines « *Foeniculum vulgare L* », ainsi que la composition de l'huile de fenouil par CG/MS, CPG et détermination de la composition de la poudre obtenue des graines par FRX.

V.1. Détermination du taux d'humidité

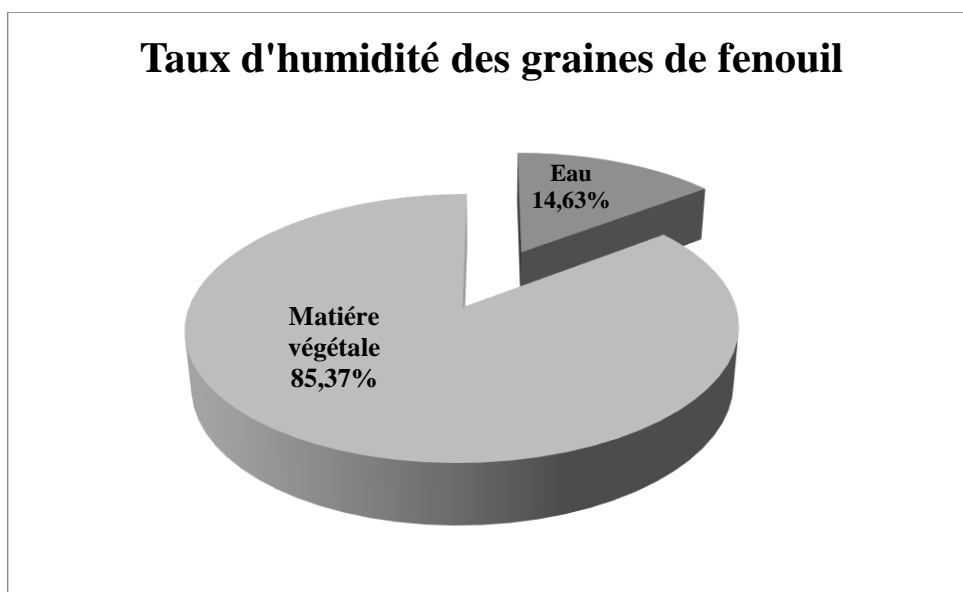


Figure V 1: Taux d'humidité des graines de fenouil.

La **figure V.1** montre que les graines de fenouil, renferment 14,63 % d'eau alors que la matière sèche représente une quantité importante de 85,37%. Le Taux d'humidité obtenu est de 14.63%, ce taux es supérieur à celui obtenu par [74], ceci peut être dû aux conditions de stockage des graines de fenouil.

V.2. Extraction des huiles essentielles

- **Rendement d'huile essentielle de fenouil**

L'huile essentielle a été extraite des graines sèches de fenouil par un hydrodistillateur de type clevenger d'une durée de 3 h, l'huile est de couleur limpide et une odeur aromatique anisée avec un rendement de 1.55%. En générale, le rendement en huile essentielle des graines du fenouil varie de 2,5 à 6 % avec une moyenne de 3,5 % [75].

V.2.1. Caractères organoleptiques

Après l'extraction des huiles essentielles, On détermine les caractères organoleptiques de l'huile essentielle des graines de fenouil, obtenue par rapport à la norme AFNOR 2000 [76].

Les résultats sont présentés dans le tableau V.1.

Tableau V 1: Les caractères organoleptiques de l'HE des graines de fenouil.

Huile essentiel	Huile essentielle des graines de Fenouil	AFNOR (2000)
Aspect	Liquide huileux	Liquide, limpide
Odeur	Anisée, aromatique	Anisée, épicée et légèrement camphrée
Couleur	Limpide	Jaune pâle

V.2.2. Caractéristiques physiques

Les propriétés physico-chimiques sont déterminées selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (AFNOR).

Le tableau V.2 regroupe les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle des graines de Fenouil., en comparaison avec celles données par l'AFNOR.

Tableau V 2: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle des graines de Fenouil.

Les caractéristiques	Résultats Obtenus	AFNOR 2000
pH	5,2	4-6
La densité relative	0,9989	0,879 - 0,978
Indice de réfraction	1,516	1,484 - 1,508

La densité est parmi les caractéristiques physiques généralement utilisées dans la classification des huiles essentielles et l'un des paramètres de pureté. La densité de notre huile essentielle elle est inférieure à celle de l'eau. Les résultats obtenus sont conformes par la norme AFNOR [76].

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à celui de l'eau à 20°C = 1.3356. Ceci montre leur richesse en composants qui dévie la lumière polarisée. Il varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé [77]. L'indice de réfraction obtenu est de 1,516, il est conforme à la norme (AFNOR 2000)

V.2.3. Caractères chimiques

Les indices d'acide, ester et de saponification de l'H.E des graines de Fenouil sont calculés et présentés dans le **tableau V.3**.

Tableau V 3: Les indices chimiques d'HE des graines de Fenouil étudiées

Les indices	Les valeurs	AFNOR (2000)
I _a	0,879	0.9
I _e	27,292	77.95
I _s	26,292	10-40

Les caractéristiques chimiques de notre huile essentielle concordent avec ceux cités par AFNOR (2000) indiquant que les valeurs des indices d'acide et de saponification d'une huile essentielle ne dépassent pas en générale 0,9 et 10-40 respectivement [76].

- L'I_a est un critère de qualité indiquant la quantité d'acides gras libres présents dans notre huile essentielle et la susceptibilité de l'HE à subir des altérations notamment l'oxydation [78], il est augmenté avec la durée de la conservation au cours de laquelle les huiles essentielles pourraient être oxydées et dégradées rapidement.
- L'I_s indique le nombre de milligrammes de base nécessaire pour saponifier complètement 1 gramme de corps gras (huile ou graisse).
- Dans notre cas, il faut 26,292 g de soude pour saponifier 1g d'huile de fenouil ainsi ce qui veut dire que l'huile est riche en acides gras.

Les esters sont des molécules à peu près privées de toxicité aux doses physiologiques normales. On a obtenu dans nos résultats un taux d'indice d'ester de 27,171.

Les résultats obtenus indiquent que les caractéristiques organoleptiques et les caractéristiques physicochimiques des échantillons analysés oscillent dans des intervalles comparables aux normes internationales reconnues. Ces paramètres diffèrent suivant l'origine des espèces étudiées.

Les valeurs obtenues, témoignent l'influence de la technique d'extraction sur les caractéristiques des huiles essentielles, ces paramètres étant influencées aussi par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes, il est logique que leurs valeurs diffèrent d'un endroit à l'autre [77].

V.2.4. Analyse chromatographique des huiles essentielles de fenouil

V.2.4.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle des graines de fenouil nous a permis d'identifier quatre composés majoritaires illustrés dans le Tableau V.4.

Tableau V 4: Principaux Composés en % de l'huile essentielle des graines de Fenouil.

Principaux Composés en % de l'huile essentielle des Graines de Fenouil.			
Nom des composés	Pic N°	Tr (mn)	Fenouil
α -Thujène	01	11.87 mn	0.60 %
α -pinène	02	12.66	0.02 %
Sabinène	03	14.15	0.20 %
β -pinène	04	14.30 mn	0.04 %
Myrcene	05	15.28	0.24 %
a.phellandrene	06	16.04	0.06 %
Para-Cymene	07	17.38 mn	0.15 %
Limonène	08	17.85 mn	6.75 %
Béta Phellandrène	09	18.011	0.38 %
Z-Ocimene	10	18.37 mn	0.38 %
1.8 Cineol	10	18.23	0.51 %
gamma- terpinène	11	19.70	0.18 %
Fenchone	12	21.89	2.84 %
Estragol	13	30.55 mn	52.04 %
Trans -Anetol	14	30.83	33.18 %
<i>Nerol</i>	15	35.75 mn	0.67 %

L'analyse par CPG a permis l'identification de 15 constituants d'HE des graines de fenouil.

D'après les résultats rapportés dans le **Tableau V.4** nous constatons que :

- L'**Estragol** est le composé majoritaire (**52.04 %**). Puis le trans anethol avec 33.18%, limonène (**6.75 %**) et enfin le Fenchone (**2.84 %**)
- Le reste des composées représentent un très faible pourcentage, exp : *Nerol* (0.67 %), α -Thujène (0.60 %), et 1.8 Cineol 0.51 % Nos résultats sont en accord avec ceux obtenu par [6]

V.2.4.2 Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par GC/MS

L'étude de la composition de l'huile essentielle de par la méthode de chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle des graines de fenouil nous a permis d'identifier huit composés majoritaires illustrés dans le Tableau V.5.

Tableau V 5: Composition chimique de l'huile essentielle des graines de *foeniculu vulgare L.*

N°	Nom de composé identifier	Temps de rétention (min)	Pourcentages (%)
1	Estragol	21.748	85.92
2	Limonene	8.911	7.50
3	Fenchone	12.426	2.27
4	Trans-anethole	26.224	0.99
5	α -Pinene	4.653	0.76
6	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-,(E)-	9.472	0.56
7	γ -Terpinene	6.002	0.31
8	γ -Terpinene	10.500	0.26
9	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-	23.377	0.26
10	β -Myrcene	6.820	0.22
11	Apiol	46.914	0.20
12	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimethyl-	22.611	0.13
13	α -Phellandrene	7.345	0.12
14	Cycloheptane	44.353	0.10
15	1,3,7-Octatriene	24.332	0.08
16	Camphor	15.936	0.07
17	Camphene	5.082	0.04
18	Cyclopentanol, 1-(methylenecyclopropyl)-	15.336	0.04
19	Germacrene D	37.460	0.04
20	1-Cycloheptene-3-carboxamide	43.404	0.04
21	1,3,6-Octatriene	10.020	0.03
22	3,4-Octadiene	15.684	0.03
23	1-(2'-Methyl-2'-propenyl)tricyclo4.1.0(2,7)] heptane	33.619	0.03
	Pourcentage total de tous composés retenus dans ce tableau		100 %

Parmi les composés identifiés, le constituant majeur qui est l'Estragol avec une teneur de 85,92% suivi de Limonene (7,50%), Fenchone (2.27%) qui pourrait expliquer les activités antioxydants et antimicrobienne.

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par [79] [80] qui ont trouvé plus de 20 composés identifiés par GC-MS pour la même plante : estragole, limonène, α -Pinene, γ -Terpinene, camfor, Trans-anethole, L-Fenchone [79] [80].

Les composants essentiels de l'huile essentielle de fenouil, révélé par CPG sont confirmé par GC-MS, sont l'estagrol, fenchone et limonene.

V.2.4.3 La spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les résultats de l'analyse de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de l'huile essentielle des graines de fenouil sont illustrées par la figure V.2.

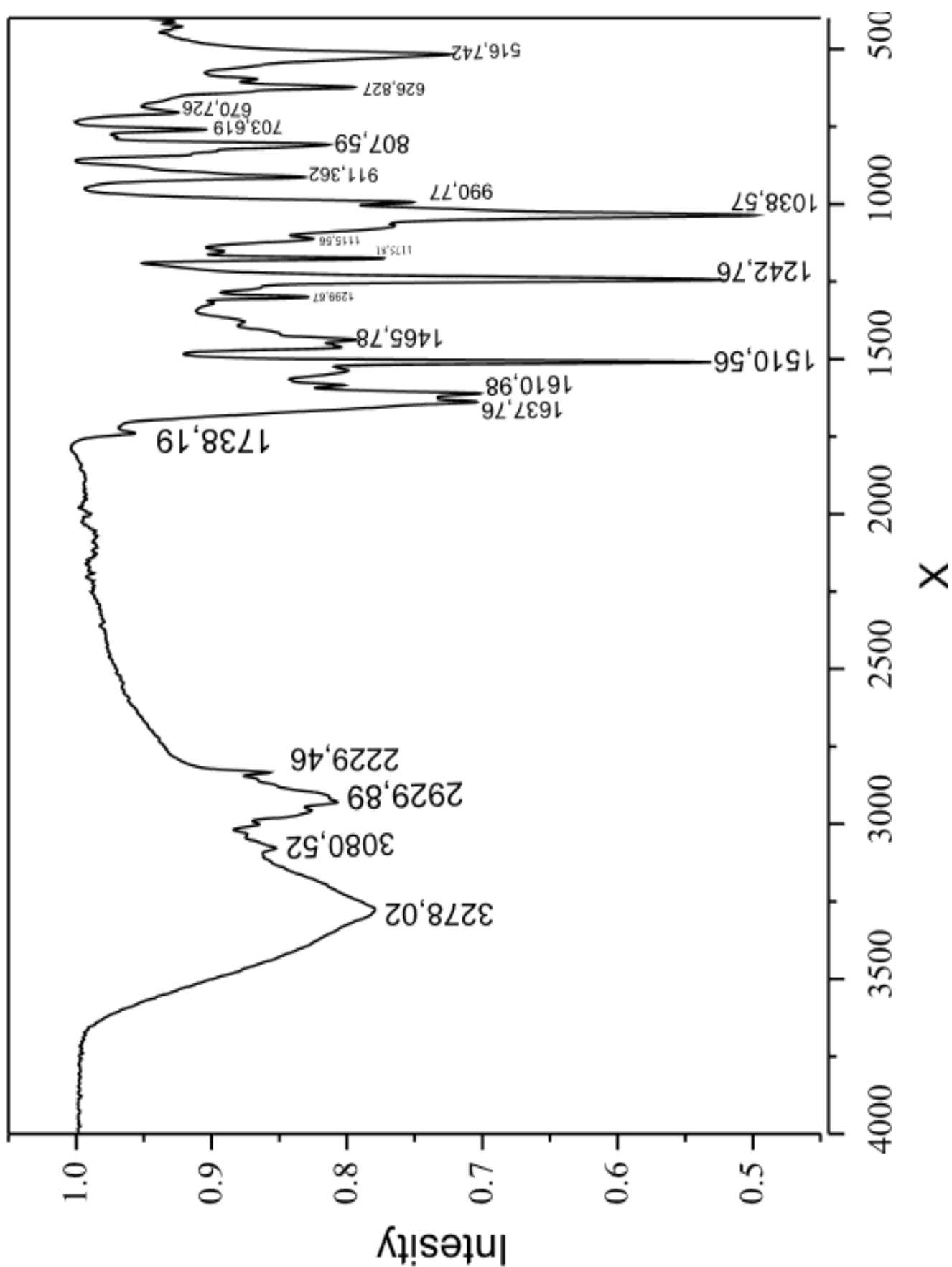


Figure V 2: spectre FTIR pour HE des graines de fenouil.

Tableau V 6: Caractérisation HE des graines de fenouil par spectroscopie FTIR.

Les liaisons chimiques	Les nombres d'ondes (cm ⁻¹)	Molécule
=C-H	3278.02	Lipides
C=O	2929.89	Triglycérides
Amide I	1637.76	Protéines
CH ₂ cisaillement	1465.78	Lipides
C-O-C	1242.76	Oligo- et Poly- saccharides
C-OH	1038.57	-
Cycle Aromatique	990.77	-

Selon le **tableau V.6** On observe que le pic à 3278.02 cm⁻¹ de faible intensité avec une bande plus large, et une bande large de 2929.89 cm⁻¹, les deux pics sont attribués aux vibrations de liaison =C-H contenue dans les lipides. Les pics 1242.76 et 1038.57 correspondent aux liaisons C-O-C des polysaccharide et C-OH de l'acide carboxylique respectivement [81].

V.2.5. Analyse chimique par la fluorescence X

La répartition des teneurs chimiques en éléments majeurs et mineurs dans la poudre des graines de fenouil est rapportée dans le **tableau V.7**.

Tableau V 7 : Principaux minéraux en % de la poudre des graines de Fenouil.

Type d'Echantillon : Oxyde/ Poudre		
No.	Elément	Résultats (% massique)
1	C	64.1913
2	N	1.5875
3	O	27.029
4	Na	0.1597
5	Mg	0.3922
6	Al	0.0328
7	Si	0.0866
8	P	0.3529
9	S	0.3425
10	Cl	1.1095
11	K	3.035
12	Ca	1.394
13	Cr	0.0764
14	Mn	0.0102
15	Fe	0.1541
16	Ni	0.0072
17	Cu	0.0028
18	Zn	0.0076
19	Br	0.002
20	Rb	0.0012
21	Sr	0.0256

D'après le **tableau V.7**, on remarque que le carbone est le composant principale des grains de fenouil, puis oxygène, potassium, azote, calcium et le chlore avec des pourcentage de 27.02 %, 3.03 %, 1.58 %, 1.39 % et 1.10 % respectivement.

V.2.5. L'activité antibactérienne d'huile de fenouil par la méthode d'aromatogramme

L'activité antibactérienne d'HE des graines de fenouil est déterminée par la technique de diffusion (aromatogramme). C'est une méthode plus simple et plus facilement reproductible, elle est réalisée par l'ensemencement du milieu de culture avec la suspension bactérienne (l'eau physiologique+ les souches bactériennes) et déposant un disque (Wattman N° 1) imprégné

d'HE avec des différentes concentrations. Les résultats sont représentés dans le **tableau V.8** et les **figures V (3, 4, 5, 6, 7, 9 et 9)**.

Tableau V 8: Les diamètres d'inhibition des souches bactériennes.

Souches Concentration %	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Samonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
100	16,2	14,8	17,4	15,6	14,1	17
75	15,8	13,2	14,2	13,8	13,9	15,5
50	13,9	12,6	13,2	13,2	13,2	14,9
25	0	0	12,5	12,1	0	12,5

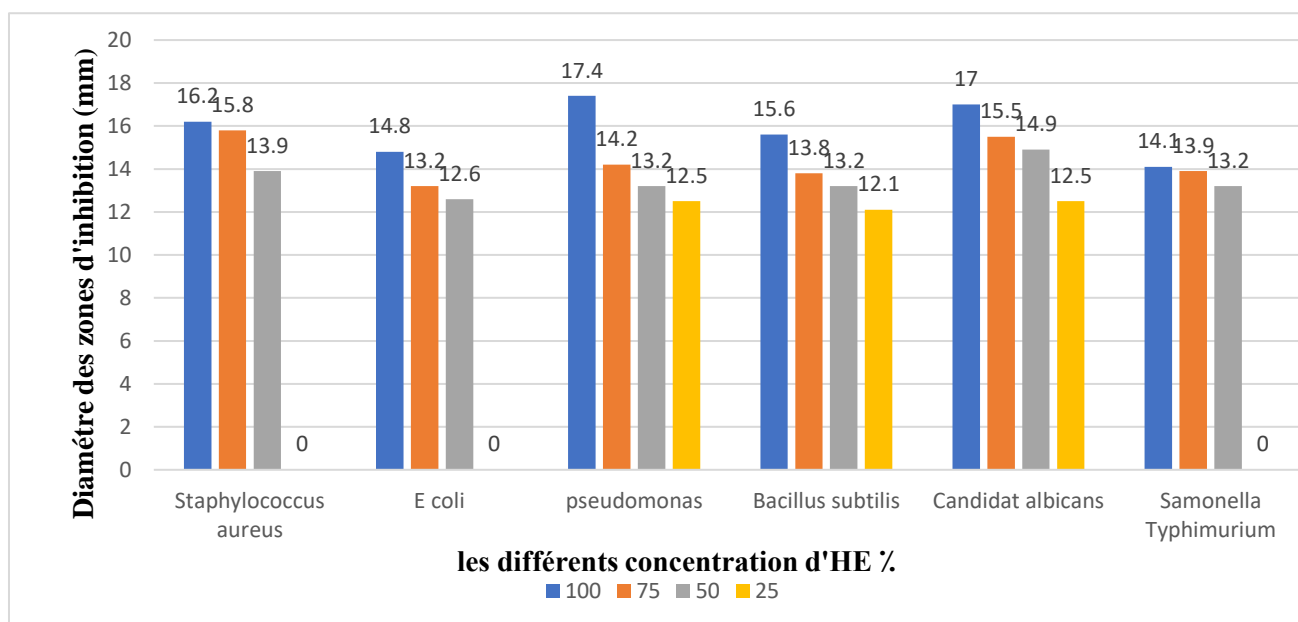


Figure V 3: Histogramme des diamètres des zones d'inhibition (mm) en fonction de la concentration ((100%), (75%), (50%), (25%)).

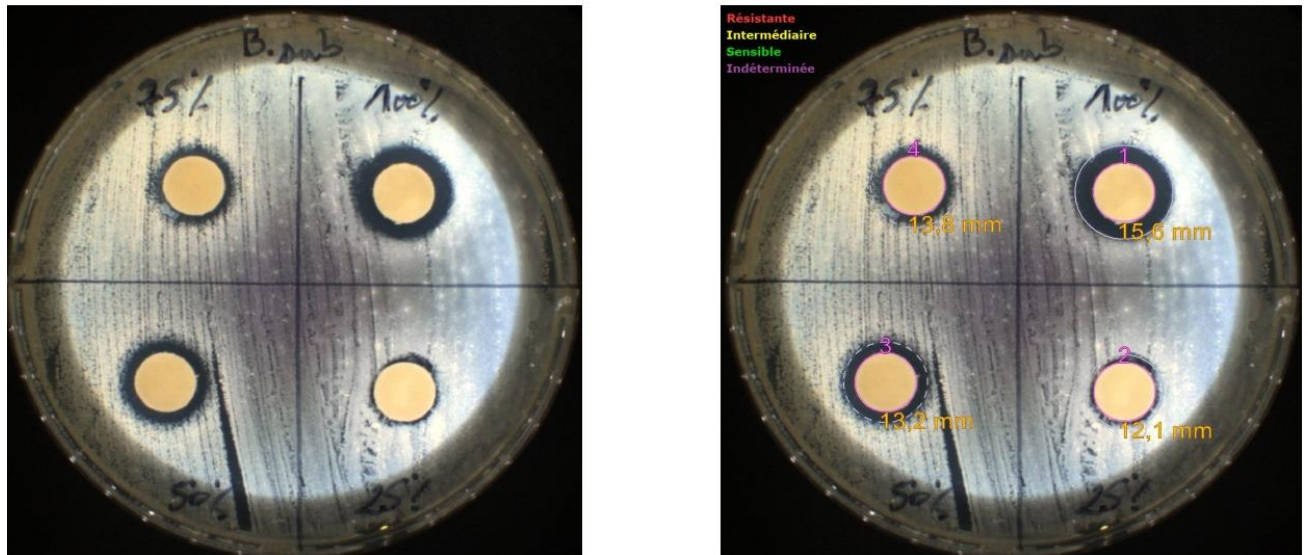


Figure V 4 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Bacillus subtilis*.

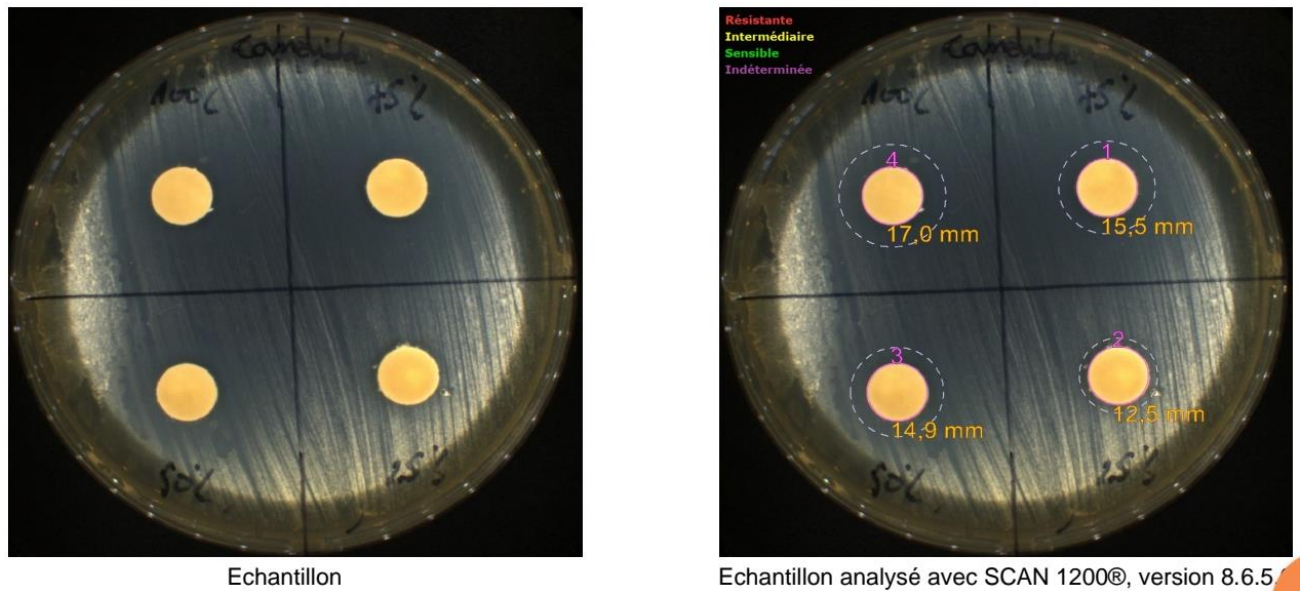


Figure V 5: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Candida albicans*.

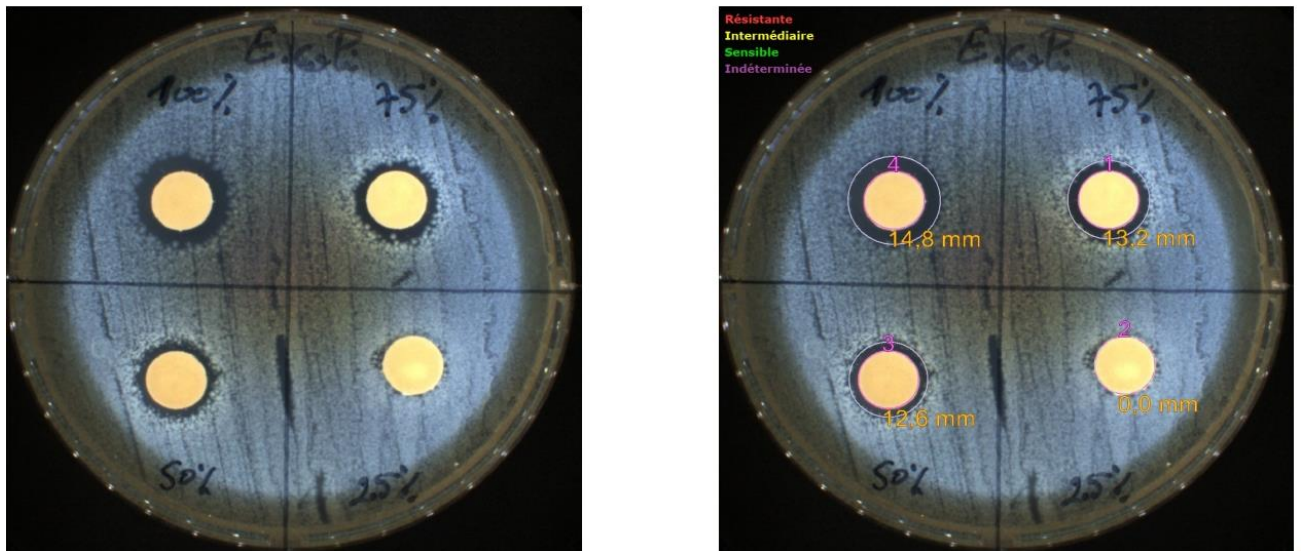
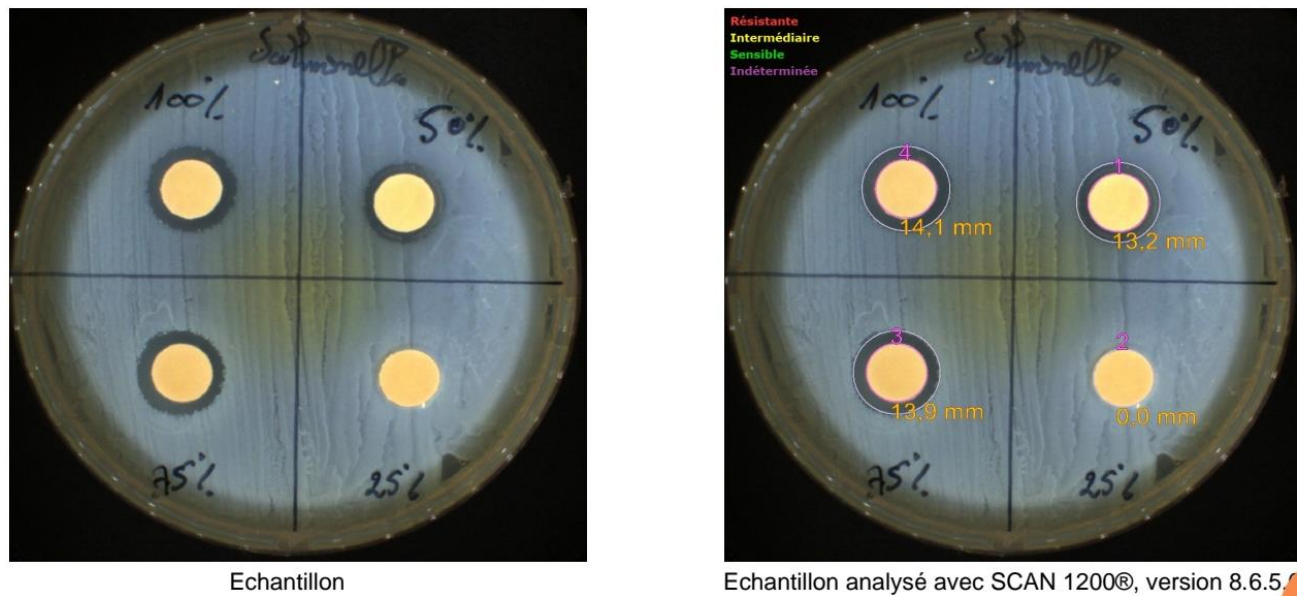


Figure V 6: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *E.coli*.



Echantillon

Echantillon analysé avec SCAN 1200®, version 8.6.5.

Figure V 7: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Samonella Typhimurium*.

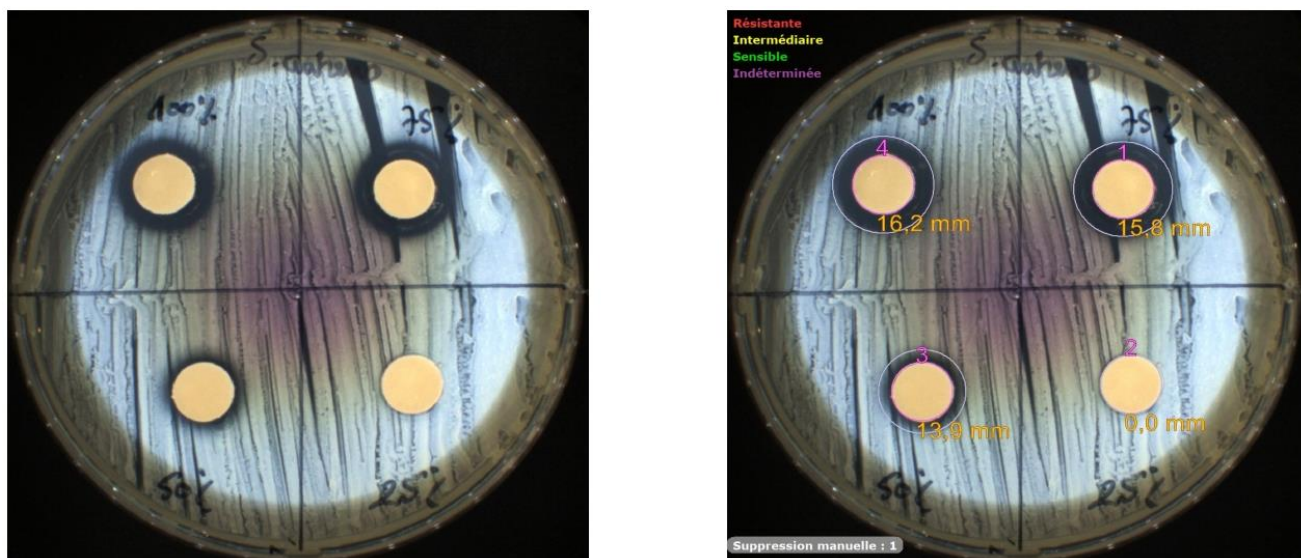


Figure V 8: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Staphylococcus aureus*.

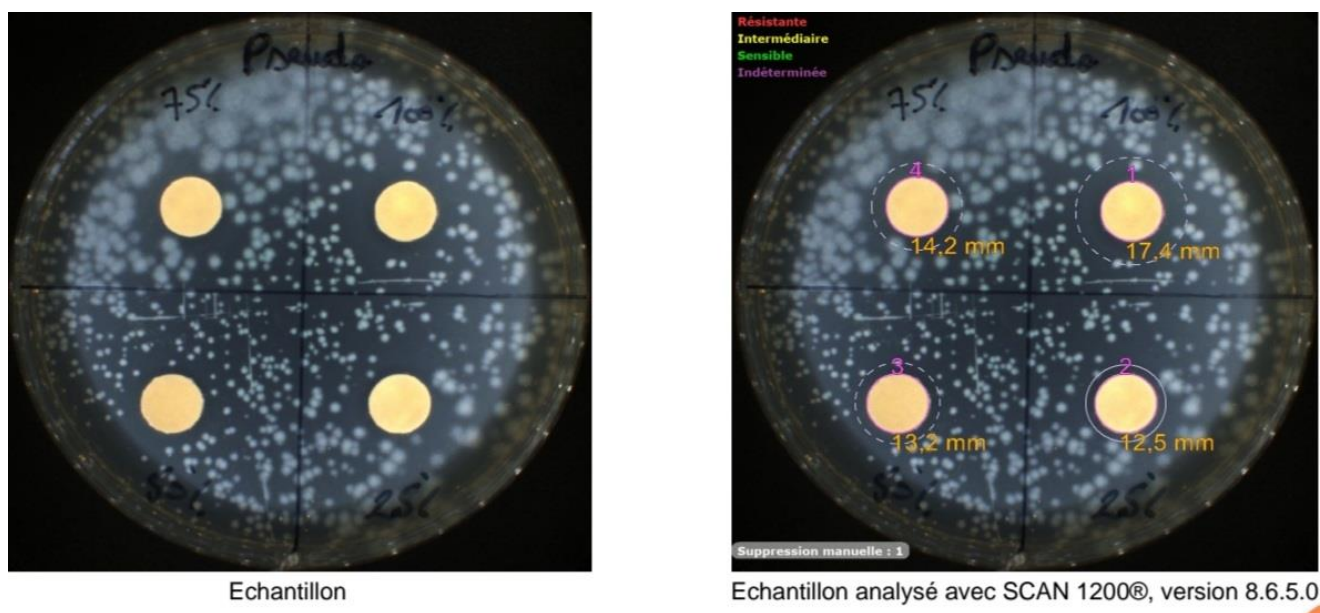


Figure V 9: Effet inhibiteur de l'huile essentielle des graines du fenouil sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Une classification des huiles essentielles en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne donnée par Meena et Sethi (1994) peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition. En ordonnant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes :

- ❖ Fortement inhibitrice lorsque : $\text{Ø} \geq 28$ mm de la zone d'inhibition.
- ❖ Modérément inhibitrice lorsque : $28 \text{ mm} > \text{Ø} > 16$ mm de la zone d'inhibition.

- ❖ Légèrement inhibitrice lorsque : $16 \text{ mm} > \emptyset > 10 \text{ mm}$ de la zone d'inhibition.
- ❖ Non inhibitrice lorsque : $\emptyset < 10 \text{ mm}$ de la zone d'inhibition.

D'après les résultats obtenus et représentés dans le **tableau V.8** et les **figures V (3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9)** nous constatons que l'huile essentielle des graines du fenouil a une bonne activité antibactérienne, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sont les souches les plus sensibles parmi les souches testées, avec une CMI de 25 %. Les autres souches bactériennes, sont sensibles à une CMI de 50%, avec des valeurs de 13.9 %, 13.2 % et 12.6 % pour *Staphylococcus Epidermidis*, *Samonella Typhimurium* et *Escherichia coli* respectivement. L'échelle de mesure de l'activité antibactériennes des HE, révèle que la majorité des concentrations des huiles essentielles de 25 à 100%, ont une activité légèrement inhibitrice, mis à part *Staphylococcus Epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, qui présentent une activité modérément inhibitrice à une concentration de 100% en HE.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par [5].

V.2.6. L'activité antioxydante d'huile de fenouil par la méthode de réduction de DPPH*

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des graines du fenouil est évaluée par la méthode de réduction de DPPH* en le comparant à l'acide ascorbique.

Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité Antiradicalaire} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100 \quad \text{V.1}$$

A_1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A_2 : absorbance en présence d'extrait ou standard.

Les **tableaux V (9 et 10)** représentent le pourcentage d'inhibition (%) et l'absorbance de l'acide ascorbique et l'HE des graines de fenouil.

Tableau V 9: Variation du pourcentage l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'HE des graines de fenouil.

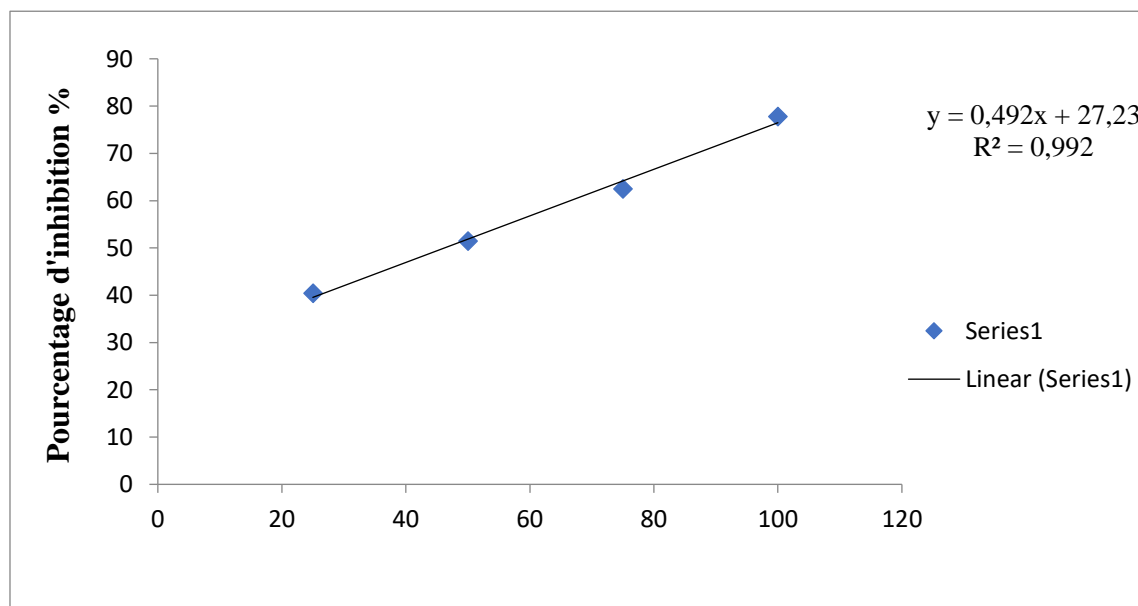
Concentration (10^{-2} µg/ml)	100	75	50	25
Pourcentage D'inhibition (%)	77,77	62,455	51,43	40,405

Tableau V 10: Variation d'absorbance et du pourcentage l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Concentration (10^{-2} $\mu\text{g/ml}$)	100	75	50	25
Pourcentage D'inhibition (%)	97.07	92.78	67.64	52.07

Détermination de la concentration d'inhibition à 50 % (IC_{50}) :

L' IC_{50} est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est grande. Les courbes des pourcentages d'inhibition du radical libre en fonction des concentration des extraits ou des huiles nous ont permis de déterminer les concentrations d'inhibition à 50 % (IC_{50}). Celle-ci exprime la concentration de l'échantillon exigée pour réduire le DPPH en solution de 50 %.

**Figure V 10:** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'HE des graines de fenouil.

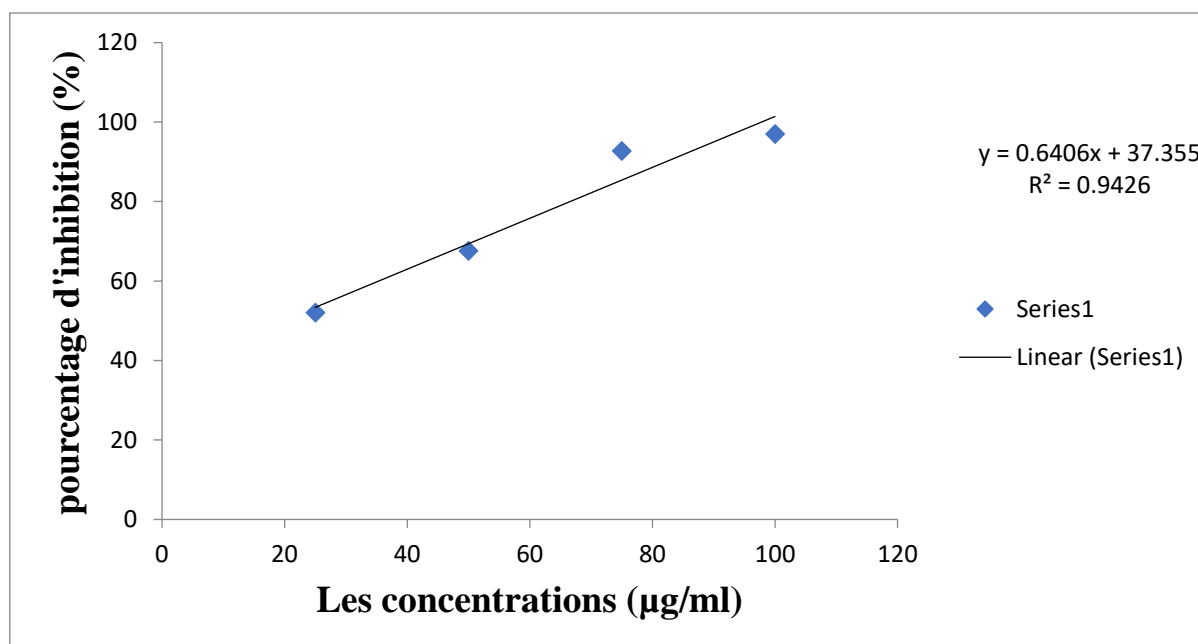


Figure V 11: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

La détermination de l'activité anti-oxydante de l'extrait par le test au DPPH a révélé que l'HE des graines de fenouil a une activité anti-oxydante de 46.75 µg /ml. Quant à l'acide ascorbique une IC₅₀ est de 19.73 µg /ml.

L'activité réductrice de l'HE des graines de fenouil est plus que 2 fois inférieure à celle de l'acide ascorbique.

V.3. Extraction des polyphénols de *Foeniculum vulgare L*

Dans cette étude, l'extraction des polyphénols de *Foeniculum vulgare L*. été réalisée par Soxhlet en utilisant des solvants organiques de différents polarité (l'éthanol, le chloroforme, l'éther éthylique et l'hexane).

Les résultats de rendements d'extraction sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau V 11: Rendement d'extraction des extraits de *Foeniculu vulgare L.*

Plante de <i>foeniculum vulgare L.</i>	Partie collectrice	Poids des extraits (g)		Rendement d'extraction R (%)
	Les graines	Chloroforme	11 g	
Ethanol		10,99 g		36,63 %
Ether éthylrique		4,53 g		15,1 %
Hexane		1,82		6,06 %

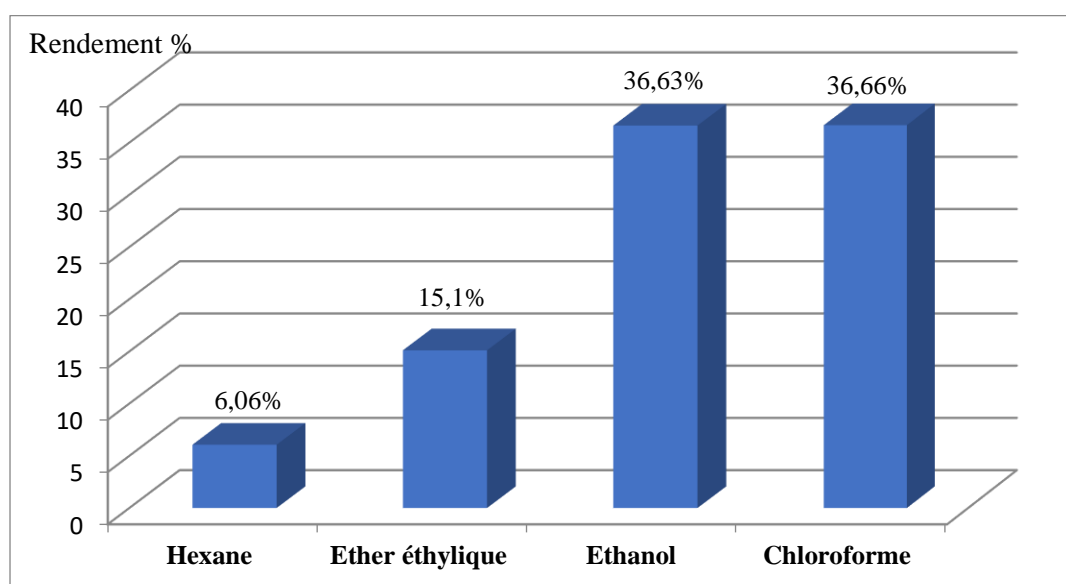


Figure V 12: histogramme du rendement de l'extraction.

D'après le tableau V.11 et la figure V.12, le rendement obtenu par le chloroforme 36,66 % est similaire à celui obtenu par l'éthanol 36,63 %, par ailleurs l'éther éthylique à un rendement moyen de 15,1 % par rapport au chloroforme, l'hexane à le plus faible rendement en polyphénols 6,06 %, nos résultats sont en accord avec celle de la littérature.

V.3.1. Dosage des composés phénoliques, flavonoïdiques et tannins

V.3.1.1 Dosage des phénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les trois extraits (éthanol, éther éthylique et Chloroforme)

par la méthode spectrophotométrie au réactif de Folin- Ciocalteu. Les teneurs obtenues sont exprimées en (mg EAG/g) (**Tableau V.5**), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

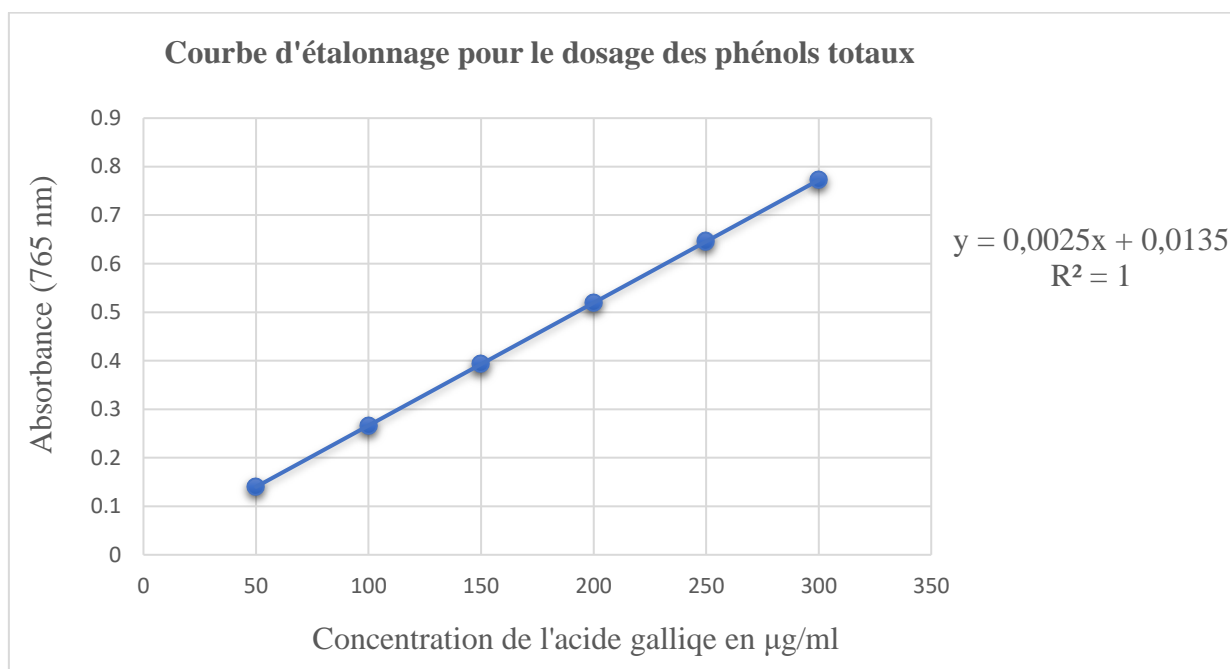


Figure V 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau V 12: Résultats du dosage des polyphénols.

Extrait	Quantité des polyphénols totaux	Equation de la courbe d'étalonnage	R ²
Ethanol	124,2 (mg EAG/g)	Y=0,0025X+0,0135	1
Chloroforme	103,8 (mg EAG/g)		
Ether éthyle	113,4 (mg EAG/g)		

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions varient entre 103,8 et 124 mgEAG/g. La concentration la plus élevée des phénols a été obtenue dans l'extrait de l'éthanol, avec un taux 124 mg EAG/g, par rapport aux extraits Chloroforme et l'éther éthylique, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre 103,8 et 113,4 mg EAG/g respectivement.

D'après ces résultats, on remarque que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend que la polarité du solvant utilisé pour l'extraction. On remarque que l'extrait de l'éthanol est plus riche en polyphénols. Nos résultats se rapprochent à ceux obtenus par [82].

V.3.1.2 Dosage des tannins totaux

La linéarité de la droite de régression de la courbe d'étalonnage a été évaluée en préparant des solutions standards de catéchine à des gammes de concentration de (0-400µg/ml). Pour la teneur totale en tannins. L'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées $Y = 0,0036X + 0,099$ ($R^2 = 1$).

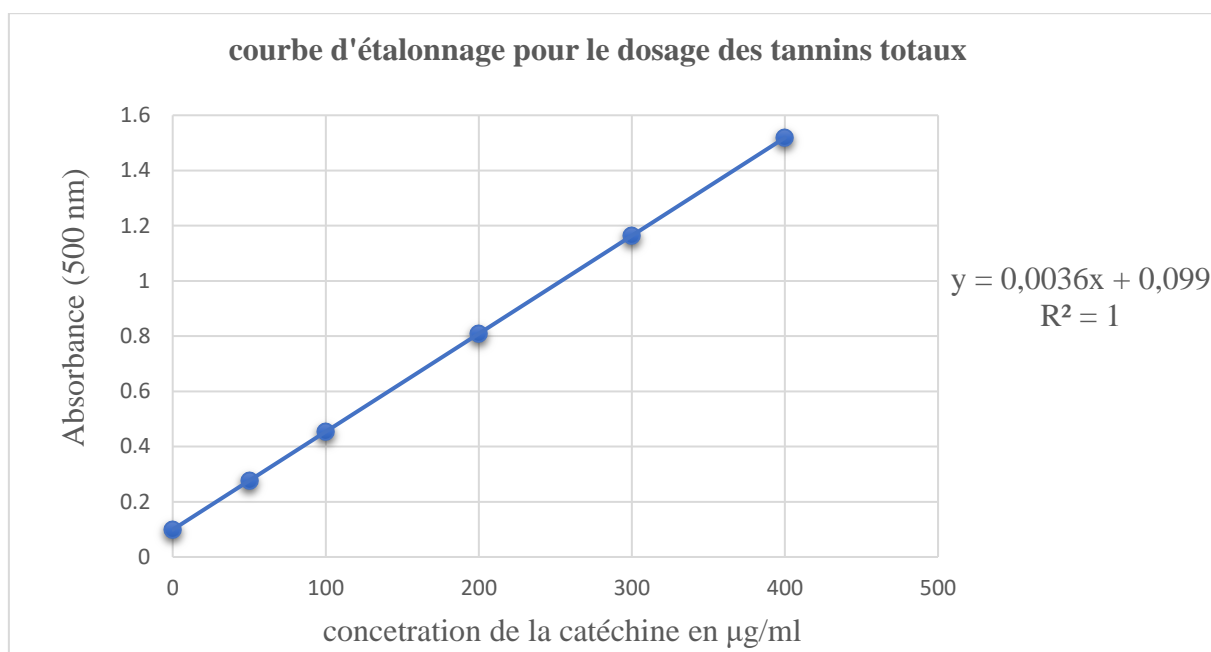


Figure V 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Tableau V 13: Résultats du dosage des tannins.

Extrait	Quantité des tannins totaux	Equation de la courbe d'étalonnage	R ²
Ethanol	185 (mg EC/g EX)	Y=0,0036X+0,099	1
Chloroforme	75 (mg EC/g EX)		
Ether éthylique	155,83 (mg EC/g EX)		

Le tableau V.13, montre que la fraction éthanol renferme les plus importantes teneurs en tannins condensés, avec une valeur de 185 mg EC/g EX. En revanche, les fractions chloroforme et éther éthylique ont enregistré des teneurs plus faibles ; leurs concentrations ont atteint 75 et 155 mg EC/g EX respectivement. Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction

des tannins condensés, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires [83].

V.3.1.3 Dosage des flavonoïdes totaux

La linéarité de la droite de régression de la courbe d'étalonnage a été évaluée en préparant des solutions standards de quercétine dans l'éthanol à des plages de concentration de (0-40 μ g/ml) pour la teneur totale en flavonoïdes. L'équation obtenue à partir du graphique d'étalonnage linéaire des concentrations étudiées $Y = 0,081X - 0,0087$ ($R^2 = 0,9983$) où y représente la valeur de l'absorbance et X est la valeur de la concentration de quercétine.

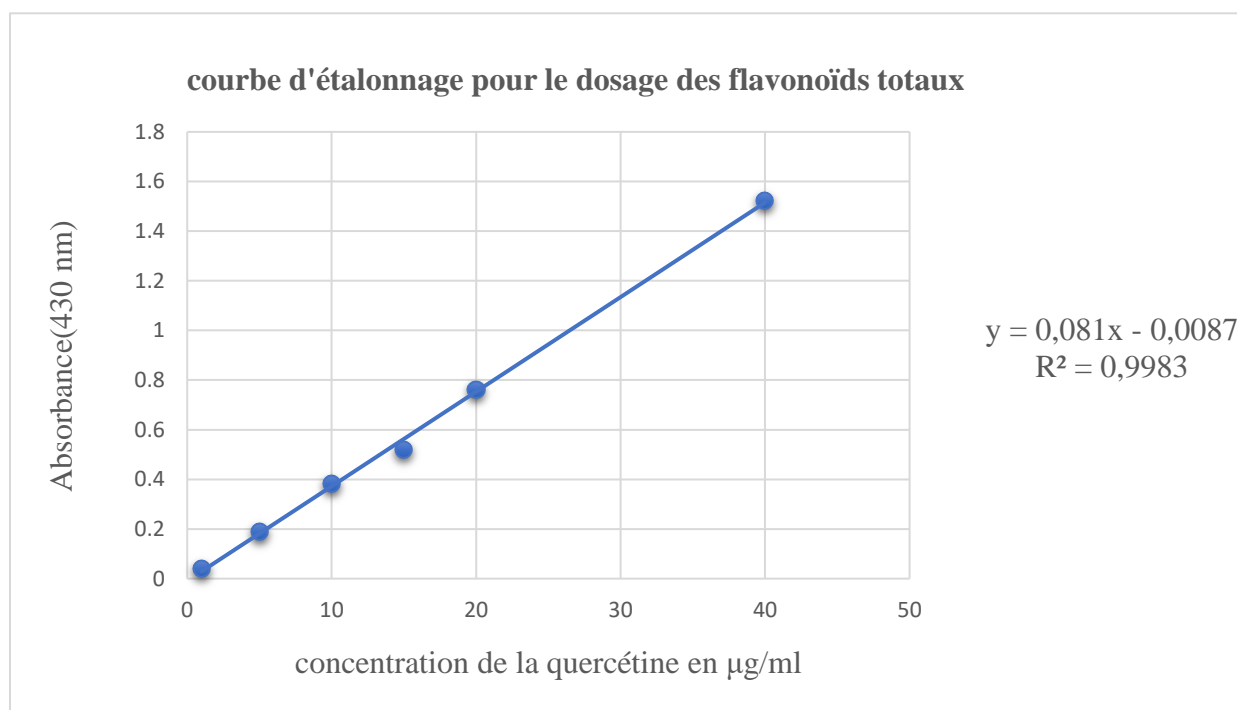


Figure V 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Tableau V 14 : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux

Extrait	Quantité des flavonoïdes totaux	Equation de la courbe d'étalonnage	R^2
Ethanol	8,803 (mg EQ/g EX)	$Y = 0,081X - 0,0087$	0,9883
Chloroforme	9,06 (mg EQ/g EX)		
Ether éthylique	9,359 (mg EQ/g EX)		

Les résultats présentés dans le Tableau **V.14** montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait éther éthylique enregistre un maximum de flavonoïdes (9,359 mg EQ/g EX), similaire à celui obtenu par le chloroforme (9,06 mg EQ/g EX). Tandis que la plus basse concentration des flavonoïdes a été mesurée dans l'extrait éthanoïque (8,803 mg EQ/g EX).

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits **[84]**.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles extraites des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare L.*).

La détermination des propriétés physico-chimiques d'huile nous a conduits à des valeurs conformes aux normes établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

La composition chimique des H.E, a été établie à l'aide de méthodes chromatographiques à phase gazeuse couplé par spectrophotométrie de masse (GC-MS) et confirmé par CPG. Ces techniques révèlent que les huiles essentielles étudiées sont constituées principalement de produit majoritaire dans L'H.E des graines de fenouil tel que L'Estragol 52.04 et le trans anethol 33.18 %, par contre, limonène et Fenchone, ont un pourcentage de 7.40% et 2.84% respectivement.

L'activité antimicrobienne réalisée a permis d'évaluer l'activité des H.E des graines de fenouil sur cinq souches bactériennes par la méthode de l'aromatogramme. Les résultats, obtenus par cette méthode, ont montré que les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sont les plus sensibles avec CMI de 25%. Les autres souches bactériennes *Staphylococcus Epidermidis*, *Samonella Typhimurium*, et *Escherichia coli* ont une CMI de 50%.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'huile essentielle extraite des graines de fenouil a été évaluée par La méthode de réduction du DPPH, cette dernière a réduit le radical DPPH• Avec une IC₅₀ de 46.75µg/ml, ce résultat est légèrement inférieure à celui obtenu par l'acide ascorbique avec une IC₅₀ qui est de 19.73 µg/ml.

Enfin, d'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'huile essentielle des graines de fenouil a une activité antibactérienne et antifongique intéressante et elle a montré une très bonne activité antioxydante.

La concentration la plus élevée des phénols et tanins ont été obtenue dans l'extrait de l'éthanol, suivi de Chloroforme et l'éther éthylique, par contre pour les flavonoïdes, l'éther éthylique à donner plus de rendement par rapport à l'éthanol et le le chloroforme. La quantité des composés phénoliques, tanins et flavonoïdes des graines étudiées dépend essentiellement : de leur origine, la variété la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales,

Conclusion générale

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une autre étude plus approfondie sur les huiles essentielles des graines de fenouil, par l'optimisation de l'extraction des huiles essentielles, par d'autres techniques tel que l'extraction assistée par micro-onde, et de déterminer l'activité antioxydante, par d'autres techniques notamment la bêta carotène.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] ALILI, Dahmane, BRAHIM, Oussama, et DOUMANDJI, Amel. Obtention et caractérisation physicochimique et chromatographique de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. (Fenouil sauvage). *AGROBIOLOGIA*, vol. 12, no 1, p. 2850-2861, 2022.
- [2] ZAITER, Ali. Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines. *Agronomie. Université de Lorraine, Français*, p. p82-147, 2017.
- [3] FILLIAT, Paloma. Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. *Mémoire de Doctorat. Université Joseph Fourier, France, 129p*, 2012.
- [4] Zoubiri S et al. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal Of Chemistry* .7:480-485 ; 2014.
- [5] Naouel ouis, étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, thèse de doctorat Université d'Oran 1, 2015.
- [6] BOUGUERRA M. A. Étude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. *Mémoire Présenté Pour L'obtention Du Diplôme De Magister, Université Mentouri Constantine*, page 27, 2012.
- [7] ABDESSLEM, Souhir Ben, ELBAZ, Mounira, BOULARES, Mouna, *et al.* Value adding search among a selection of Tunisian fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) cultivars: Nutritional composition, chlorophyll and β -carotene contents of fennel seeds. *JOURNAL OF OASIS AGRICULTURE AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT*, vol. 4, no 2, p. 110-116, 2022.
- [8] OKTAY M et al. Détermination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 263–271, 2003.
- [9] SHAMKANT B ., BADGUJAR et al. *Foeniculum vulgare* Mill : A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* ; Article ID 842674, 32, 2014

Références bibliographiques

- [10] RATHER, Manzoor A., DAR, Bilal A., SOFI, Shahnawaz N., *et al.* Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 9, p. S1574-S1583, 2016.
- [11] KOOTI, Wesam, MORADI, Maryam, ALI-AKBARI, Sara, *et al.* Therapeutic and pharmacological potential of Foeniculum vulgare Mill: a review. *Journal of HerbMed Pharmacology*, vol. 4, no 1, p. 1-9, 2015.
- [12] BESSAM, F. H. et MEHDADI, Zoheir. Evaluation of the antibacterial and antifongical activity of different extract of flavonoïques Silybum marianum L. *Adv Environ Biol*, vol. 8, p. 1-9, 2014.
- [13] AHMED, Ejaz, ARSHAD, Muhammad, KHAN, Muhammad Zakriyya, *et al.* Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017, vol. 6, no 2, p. 205-214.
- [14] AHMED CHAOUCH, Meroua et SEGHIRI, Ramdane. *Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires et évaluation de l'activité biologique d'une espèce de la famille Scrophulariaceae*. Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri-Constantine 1. 2019.
- [15] Balasundram N., Kalyana Sundram K. and Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006. 99:191-203.
- [16] EKALU, Abiche et HABILA, James Dama. Flavonoids: isolation, characterization, and health benefits. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2020, vol. 9, no 1, p. 1-14.
- [17] EMERAUX, Elise. *Propriétés biologiques des flavonoïdes: étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante*. 2019. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.

Références bibliographiques

- [18] RIRA, Moufida. *Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical*. 2019. Thèse de doctorat. Université Clermont Auvergne [2017-2020].
- [19] REF'AT, A. Alkurd, TAKRURI, Hamed R., et AL-SAYYED, Heba. Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2008, vol. 4, no 3, p. 265-274.
- [20] THOMAS, D. *Les antioxydants de nos jours: définition et application*. 2016. Thèse de doctorat. thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges. France.
- [21] Djilani, Abdelouaheb, and Amadou Dicko. "The Therapeutic Benefits of Essential Oils." *Nutrition, well-being and health* 7 (2012): 155-79.
- [22] Fernandez, Xavier, Romain Monge, and Claude Chailan. "La Production Des Huiles Essentielles En France." Vuibert, 2012.
- [23] Kaloustian, Jacques, and Francis Hadji-Minaglou. *La Connaissance Des Huiles Essentielles: Qualitologie Et Aromathérapie; Entre Science Et Tradition Pour Une Application Médicale Raisonnée*. Springer, 2012.
- [24] Chahrazed Boutekedjiret, « Etude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences de Romarins. Transfert de matière et modélisation ». Thèse de Doctorat d'Etat, Septembre 1999. Algérie.
- [25] Bourrain, J-L. "Allergies Aux Huiles Essentielles: Aspects Pratiques." *Revue Française d'Allergologie* 53 (2013): 30-32.
- [26] Bowles, E. Joy, chemistry of aromatherapeutic oils, 3rd Edition, 2003.
- [27] Garnéro J, «Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation». Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*. France, 1991.

Références bibliographiques

- [28] Chami Fouzia, Evaluation in vitro de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires in vivo Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés, thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah Faculté des Sciences Dhar El Mehrez Fès,2005.
- [29] Laëtitia Muther, UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES CHEZ L'ENFANT, thèse de doctorat, université d'Auvergne, 2015.
- [30] Dominique Baudoux, "Chapitre 6. Propriétés Physiques Des Essences Et He." In *Aromathérapie*. 37-38. Paris: Dunod, 2017.
- [31] Chibani, Salih, and Zahia Kabouche. "Etude Phytochimique Et Biologique De Six Plantes Médicinales De L'est Algerien." (2017).
- [32] Robin Deschepper, variabilité se la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille,2017.
- [33] Baser K.H.C., Buchbauer G. Handbook of essential oils : science, technology and applications. CRC Press (2009). 1ère éd. 991p.
- [34] X fernandez et al. «La chimie des huiles essentielles : Tradition et Innovation». 1^{er} Ed. France, 2012.
- [35] Bouzabata Amel, CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UNE PLANTE MEDICINALE ET AROMATIQUE MYRTUS COMMUNIS L, thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba,2015.
- [36] BOUKHATEM, Mohamed Nadjib, Amine FERHAT, and Abdelkrim KAMELI. "Méthodes D'extraction Et De Distillation Des Huiles Essentielles: Revue De Littérature." *Une* 3, no. 4 (2019): 1653-59.

Références bibliographiques

- [37] Lucchesi, Marie-Elisabeth. "Extraction Sans Solvant Assistée Par Micro-Ondes Conception Et Application À L'extraction Des Huiles Essentielles." Université de la Réunion, 2005.
- [38] HERZI, Nejia. *Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles*, Thèse de doctorat, institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse),2013.
- [39] FEKIH, NADIA. "Propriétés Chimiques Et Biologiques Des Huiles Essentielles De Trois Espèces Du Genre Pinus Poussant En Algérie." 2014.
- [40] PIERRON Charles. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie, gérontologie et soins palliatifs. Thèse de Doctorat UNIVERSITÉ DE LORRAINE. 2014.p27.
- [41] Rodríguez-Solana, Raquel, José Manuel Salgado, José Manuel Domínguez, and Sandra Cortés-Diéguez. "Estragole Quantity Optimization from Fennel Seeds by Supercritical Fluid Extraction (Carbon Dioxide–Methanol) Using a Box–Behnken Design. Characterization of Fennel Extracts." *Industrial Crops and Products* 60 (2014): 186-92.
- [42] Figueredo, Gilles. "Etude Chimique Et Statistique De La Composition D'huiles Essentielles D'origans (Lamiaceae) Cultivés Issus De Graines D'origine Méditerranéenne." Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, 2007.
- [43] Jamila HADJ SALEM, extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de nitrariaretusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique, thèse de doctorats ; université de Lorraine,2009.
- [44] Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.(2003).
- [45] M Lahlow. « Méthodes to study the phétochemistry and bioactivity of essential oils». Revue article. Wiley interscience. Morocco, 2004.

Références bibliographiques

- [46] Rozman, T.; Jersek, B. *Acta agriculturrae Slovenica* 2009, 93(1); 51-580.
- [47] Bouzid, Djihane. "Évaluation De L'activité Biologique De L'huile Essentielle D'une Plante Endémique Hélichrysum Italicum (Roth) G. Don.", Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif1, 2018.
- [48] Nazzaro, Filomena, Florinda Fratianni, Laura De Martino, Raffaele Coppola, and Vincenzo De Feo. "Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria." *Pharmaceuticals* 6, no. 12 (2013): 1451-74.
- [49] Pavel, M. Stevic, T. J. Serb. Chem. Soc. 2009, 75(1): 27-34.
- [50] Thafsouth HESSAS, SIMOUD Sounia, Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymus sp, Doctorat en pharmacie, 2018.
- [51] G.LEQUEUX, M.BOUTIN, 2013 aromatoigramme: mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines, journées nationales GTV, Nantes (France).
- [52] Boutabia, Lamia, et al. "Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie)." *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 85.2016 (2016): 174-189.
- [53] Bouzidi, Hakima, et al. "Le conditionnement des fraises fraîches sous "micro-atmosphère" à base d'huiles essentielles combinées: Effet durant le stockage." *Nature & Technology* 21 (2019): 35-49.
- [54] MUANDA, François Nsemi. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Université Paul Verlaine-Metz*, 2010, p. 238.
- [55] Ekoumou C. Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 2003, 145 p.

Références bibliographiques

- [56] ZERARGUI, Fatima. *Activité antioxydante des extraits de racines Tamus communis L. et caractérisation des substances bioactives*. Thèse de doctorat. 2018.
- [57] REZAIRE, Aira. *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)*. Thèse de doctorat. Antilles-Guyane. 2012.
- [58] N.Methanni, M.E. Benabdelkader, « Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques et l'activité antifongique ds huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et médicinales » Doctoral dissertation, Université de Jijel.2016.
- [59] C. Kanko et Al, C.R. Chimie J. (2004) p : 1039-1042.
- [60] Baser et Buchbauer. 2010. «handbook of essential oils science, technology and application». Volume 72 .chromatographia an interntional jurnal for separation science. USA.
- [61] C Besombes. 2008. « Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatique : application généralisées ». PFE. Université Rochelle
- [62] Koul et al. 2008. « Essential oils as pesticides». Article. Inde.
- [63] Kaur G.J. and Arora D.S., 2010. «Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae - Current status». *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 087-094.
- [64] M Isman. 2002. « Insect antiffedants ». Article. Royal society of chimestry. Canada.
- [65] Audigie C.L., Dupon G. et Zongain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1,2^{ème} ED. Doin, Paris, (1995).
- [66] DeMaack.F. et Sablier.M. Couplage chromatographique savecla spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniquesd'analyse.(1994).

Références bibliographiques

- [67] Zoubiri S et al. « Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal Of Chemistry* ».2014; 7:480-485.
- [68] Kaniki TSHAMALA, «Caractérisation environnementale des rejets minerométallurgiques du copperbelt congolais», thèse de doctorat, (2008).
- [69] W.Brand-Williams, M.E.Cuvelier, C.Berset « Use of free radical method to evaluate antioxidant activity », *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30, 1995.
- [70] Blainski, A., Lopes, G., and de Mello, J., Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 2013. 18(6): p. 6852-6865.
- [71] Singleton, V.L. and Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolic with phosphor molybdicphosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 1965. 16(3): p. 144-158.
- [72] Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., and Yao, W.B., *In vitro and in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*, 2008. 106(3): p. 888-895.
- [73] Broadhurst, R.B. and Jones, W.T., Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1978. 29(9) : p. 788-794.
- [74] Rather M et al. «*Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phyto-chemistry, pharmacology, and safety». *Arabian Journal of Chemistry*. 2012 .page3_4.
- [75] livre «les plantes médicinales». 2016. Institut Européenne des substances végétale.
V.2.1. L'analyse de l'huile essentielle des graines de fenouil
- [76] AFNOR. (2000). Les huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles.
PARA
Graphic, 2(1), Paris, 323 p.

Références bibliographiques

- [77] Alili, Dahmane, Oussama Brahim, and Amel Doumandji. "Obtention et caractérisation physicochimique et chromatographique de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.(Fenouil sauvage)." *AGROBIOLOGIA* 12.1 (2022): 2850-2861.
- [78] Seddik M, "Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d '*Ammoides Verticillata* de la région d'Adrar. Etude de son activité biologique et antioxydante", Thèse de magister, Faculté des sciences, Université d'Oran, 2010.
- [79] Aprotosoia, Ana Clara, et al. "The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.)." *Farmacia* 58.1 (2010): 46-53.
- [80] Stefanini, M. B., et al. "Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*)." *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 8 (2006): 193-198.
- [81] Michel DALIBART, Laurent SERVANT, spectroscopie dans l(infra-rouge.Techn. De l'Ing, 2000.
- [82] Douar Latrech.S 2012. Composition chimique et activité antioxydante des extraits de fenouil annuel *Ammi visnaga* Lamk. Thèse. Magister . ENSA
- [83] Y.Boumahdi, Elaboration de lotions à base d'huiles essentielles d'une plante algérienne pour lutter contre les microorganismes et parasites externes chez l'homme et l'animal. Mémoire de Magister, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene ,2014.
- [84] Chaudhary, H.J., Shahid, W., Bano, A., Ullah, F., Munis, F., Fahad, S., and Ahmad, I. *In vitro* analysis of *Cupressus sempervirens* L. plant extracts antibacterial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012. 6(2): p. 273-276.

Les annexes

Annexe 1

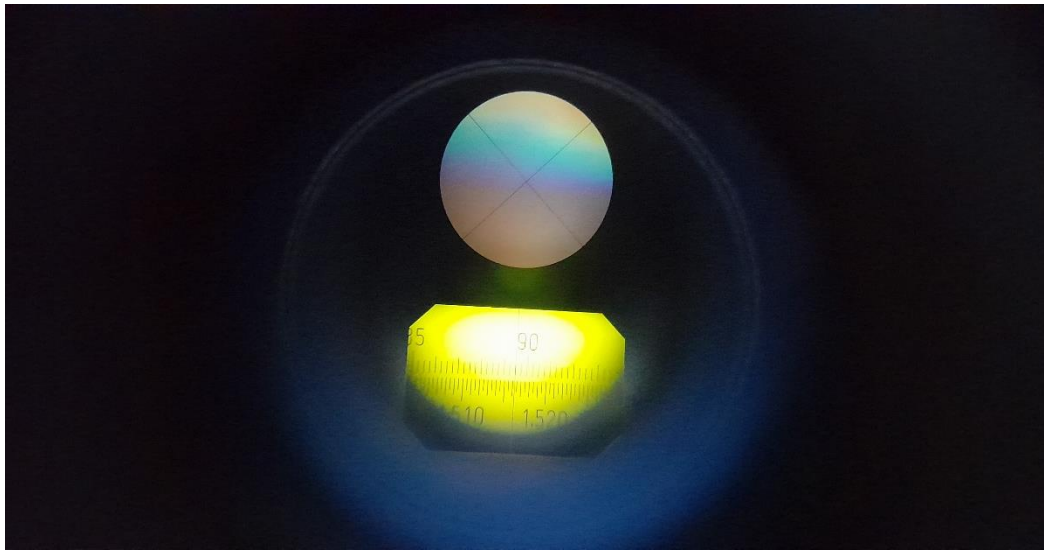
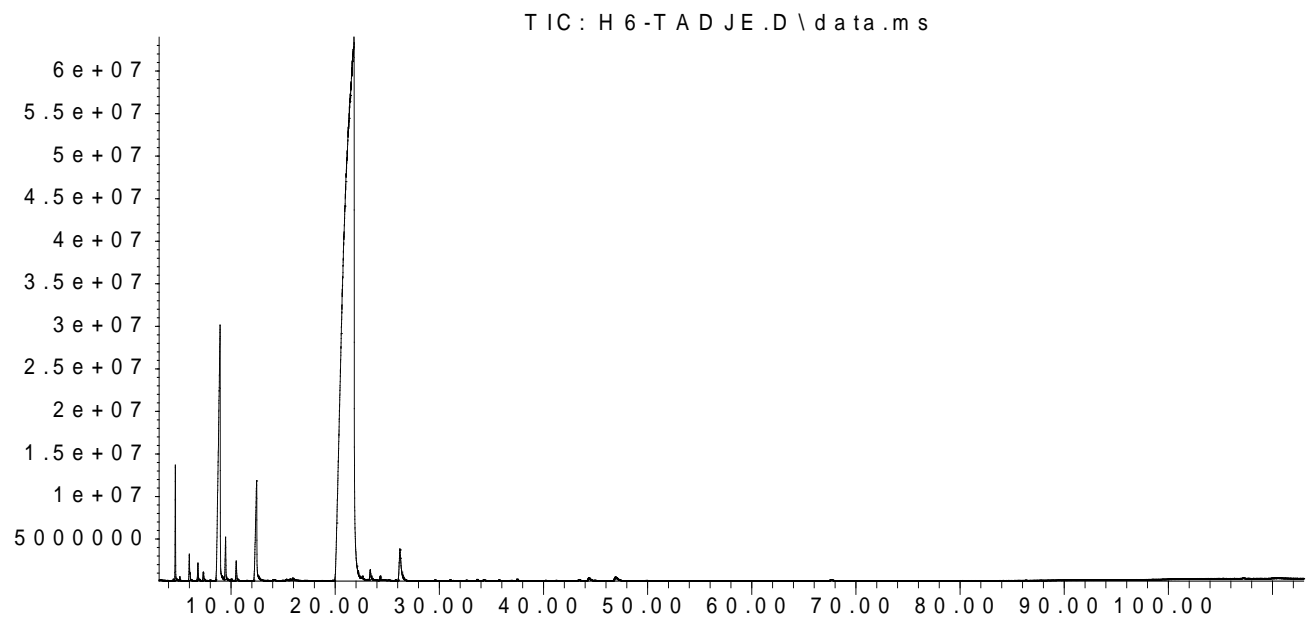


Figure 1 : Résultat de réfractomètre

Annexe 2

Abundance



Time -->

Figure 2 : chromatogramme de GCMS d'huile des graines de fenouil.

Annexes

Annexe 3

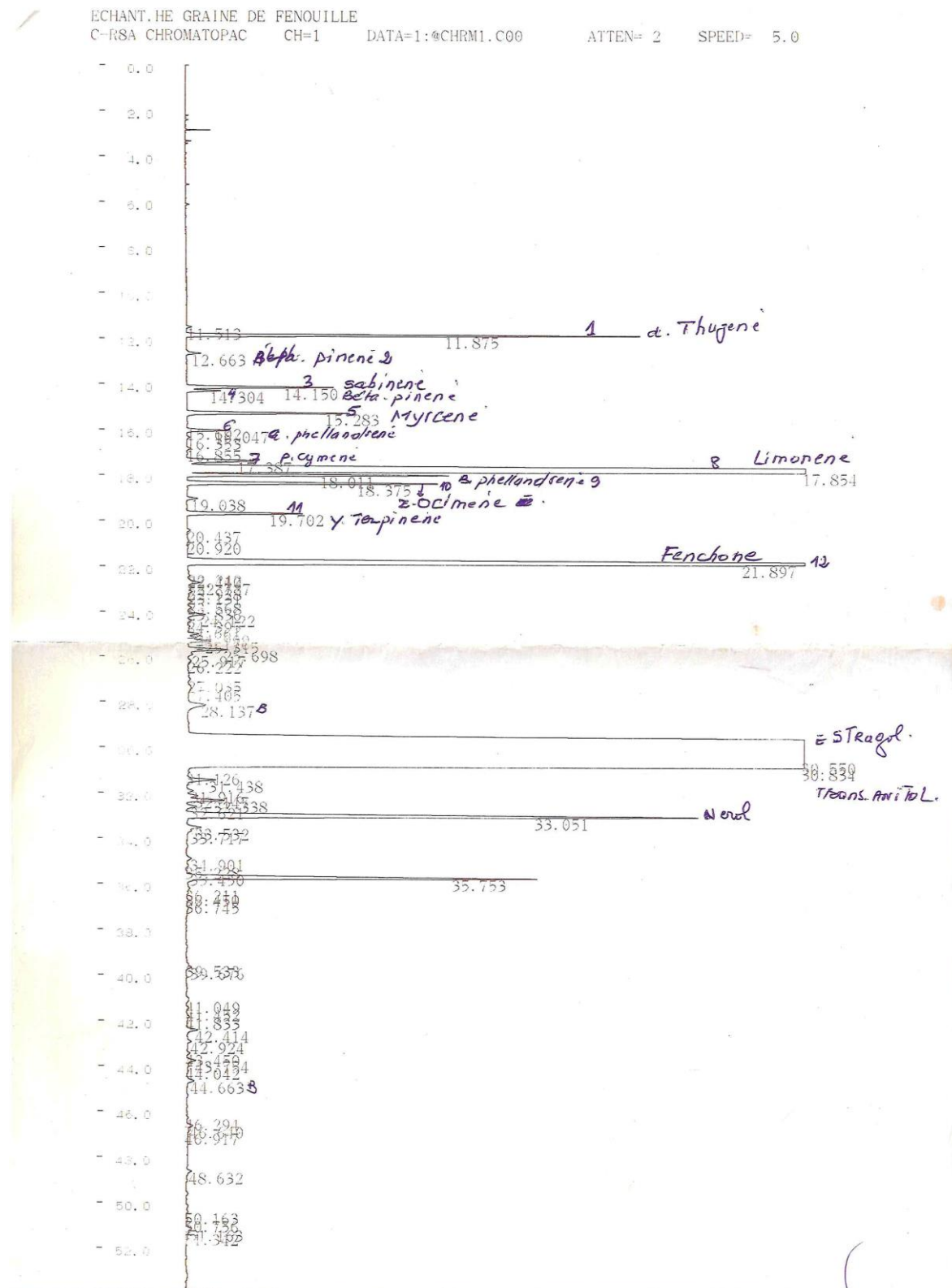


Figure 3 : chromatogramme de CPG d'huile des graines de fenouil.