
Etude biochimique des fractions lipidiques de graines de la famille des apiacées obtenues par différentes méthodes d'extraction

Auteur : Detry, Pauline

Promoteur(s) : Fauconnier, Marie-Laure

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3011>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**ETUDE BIOCHIMIQUE DES FRACTIONS
LIPIDIQUES DE GRAINES DE LA FAMILLE
DES APIACEES OBTENUES PAR DIFFERENTES
METHODES D'EXTRACTION**

DETRY PAULINE

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : MARIE-LAURE FAUCONNIER

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**ETUDE BIOCHIMIQUE DES FRACTIONS
LIPIDIQUES DE GRAINES DE LA FAMILLE
DES APIACEES OBTENUES PAR DIFFERENTES
METHODES D'EXTRACTION**

DETRY PAULINE

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : MARIE-LAURE FAUCONNIER

INSTITUTION D'ACCUEIL

Ce travail de fin d'études a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie générale et organique de Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège).

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de fin d'études et qui ont rendu ces cinq années à Gembloux inoubliables.

Avant tout, je remercie particulièrement Madame Marie-Laure Fauconnier de m'avoir donné la chance de mener mon travail de fin d'études dans son laboratoire, ainsi que pour ses conseils avisés dans les moments d'hésitation ! Je remercie également Iness Bettaieb de m'avoir encadrée sur ce sujet et tous les membres de mon jury de consacrer de leur temps à évaluer mon travail.

Ensuite, je remercie du fond du cœur toute l'équipe du Laboratoire de Chimie Générale et Organique pour son accueil, sa bonne humeur et son aide. Un immense merci à Danny qui a eu la patience de répondre à chacune de mes questions avec bienveillance et un immense savoir ! Un grand merci à Franck et Thomas également pour leur aide au labo et à Nathalie pour son écoute à toute épreuve. Merci encore à vous pour votre temps, vos conseils précieux et votre bonne humeur ! Je n'oublie évidemment pas Thierry, Matthew, Manon et Marie qui m'ont également aidée à maintes reprises durant ce travail.

Enfin, je remercie ma famille qui est ma principale source de courage et qui me donne le sourire comme rien ni personne d'autre. Je pense évidemment également à tous mes amis sans qui ces années n'auraient pas été pareilles. Merci pour tous ces beaux moments, ces fous rires et sourires, cette bonne humeur au quotidien, ces soupers copieux, cette entraide, ces stress partagés, ces épisodes de soutien noctambule, ces pauses improvisées mais nécessaires, ces séances de découpes de fourches, et tout le reste...

RÉSUMÉ

Le *Foeniculum vulgare* Mill., le *Pimpinella anisum* L. et le *Carum carvi* L. plus connus sous les noms de fenouil, anis vert et carvi respectivement, sont des plantes issues de la famille botanique des Apiacées. Ce sont des plantes aromatiques et médicinales dont les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés et sont déjà très étudiées et utilisées. Les fractions lipidiques des graines de ces plantes ont également déjà été investiguées. L'acide pétrosélinique est l'acide gras majeur de la famille des Apiacées et présente également diverses propriétés, la plus reconnue étant une activité anti-inflammatoire. A l'heure actuelle, l'extraction des huiles végétales se fait à l'aide de solvants d'origine pétrolière. Cependant, cela pose des problèmes tant au niveau environnemental et sécuritaire qu'au niveau de la santé publique. Les réglementations sont donc de plus en plus strictes et des méthodes d'extraction alternatives de plus en plus recherchées. Celles-ci consistent généralement en l'utilisation de solvants de substitution mais il est également possible d'extraire les lipides à l'aide de dioxyde de carbone à l'état supercritique. Lors de ce travail, différentes méthodes d'extraction conventionnelles et alternatives ont été explorées en vue de les comparer. Les méthodes conventionnelles ont consisté en une extraction à chaud par la méthode de Soxhlet à l'hexane et une extraction à froid par la méthode de Folch. Les méthodes alternatives testées ont été une extraction au dioxyde de carbone supercritique, à basse température, et une extraction à chaud selon la méthode de Soxhlet à l'aide d'un agro-solvant, le 2-méthyltétrahydrofurane. Les extraits lipidiques des trois types de graines obtenus par ces quatre méthodes d'extraction ont été analysés en termes de composition en acides gras, composition en stérols et activité antioxydante afin de déterminer si les méthodes d'extraction alternatives seraient capables de remplacer les méthodes actuellement utilisées. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les extractions par CO₂ supercritique et 2-méthyltétrahydrofurane représentent, en termes de qualité des huiles obtenues, des alternatives prometteuses.

ABSTRACT

Foeniculum vulgare Mill., *Pimpinella anisum* L. and *Carum carvi* L., commonly called fennel, aniseed and caraway, are plants belonging to the botanical family of Apiaceae. These are aromatic and medicinal plants. Their essential oils show many properties and are already well studied and used. The lipid fractions of their seeds have also already been investigated. The major fatty acid of Apiaceae family is petroselinic acid. This one also presents several properties, including anti-inflammatory activity which is the most known. Nowadays, vegetable oils are extracted with the help of petrosolvents. This raise issues regarding environment and security, but also public health. Regulations are more and more strict, and alternatives more and more searched. In general, those ones consist in the use of substitution solvents, but lipid extraction is also possible with the help of carbon dioxide in its supercritical state. In this work, conventional and alternative extraction methods have been explored in order to compare them. Conventional methods have consisted in a warm extraction by Soxhlet method with hexane and a cold extraction by Folch method. The performed alternative methods were a supercritical carbon dioxide extraction, at cold temperature, and a warm extraction by Soxhlet method with a bio-based solvent, 2-methyltetrahydrofuran. The lipid fractions obtained from those three seeds by those four extraction methods have been analysed in terms of fatty acids and sterols compositions and antioxidant activity. The objective of this work is to determine whether alternative extraction methods could replace current conventional methods. The obtained results allowed to conclude that extractions by supercritical CO₂ and 2-methyltetrahydrofuran constitute, regarding the quality of the obtained oils, promising alternatives.

TABLE DES MATIÈRES

INSTITUTION D'ACCUEIL	II
REMERCIEMENTS	II
RESUME	III
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTES DES FIGURES, TABLEAUX, EQUATIONS, ANNEXES ET ABREVIATIONS	VII
1. LISTE DES FIGURES	VII
2. LISTE DES TABLEAUX	VIII
3. LISTE DES EQUATIONS	VIII
4. LISTE DES ANNEXES	IX
5. LISTE DES ABREVIATIONS	X
INTRODUCTION	1
1. LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES (PAM)	1
DEFINITIONS	1
EVOLUTION DE L'UTILISATION DES PAM	1
COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DES PAM	2
Huiles essentielles	3
Composés phénoliques	3
Autres composés intéressants	4
PROPRIETES DES PAM	4
FENOUIL (<i>FOENICULUM VULGARE</i> MILL.)	5
Classification taxonomique	5
Origine et répartition géographique	5
Description botanique	5
Composition biochimique de la graine	6
Propriétés et utilisations	7
Toxicité	8
ANIS VERT (<i>PIMPINELLA ANISUM</i> L.)	8
Classification taxonomique	8
Origine et répartition géographique	8
Description botanique	9
Composition biochimique de la graine	9
Propriétés et utilisations	10
Toxicité	11
CARVI (<i>CARUM CARVI</i> L.)	11
Classification taxonomique	11
Origine et répartition géographique	11
Description botanique	12
Composition biochimique de la graine	12
Propriétés et utilisations	13
Toxicité	14
2. MATIERE GRASSE VEGETALE	14
GLYCERIDES ET ACIDES GRAS	14
Généralités	14
Acide pétrosélinique	15

PHOSPHOLIPIDES	18
STEROLS	19
TOCOPHEROLS	20
AUTRES COMPOSES LIPIDIQUES	20
3. COMPOSES PHENOLIQUES	21
DEFINITION	21
CLASSIFICATION	21
Acides phénoliques	22
Flavonoïdes	22
Tanins	22
PROPRIETES	22
4. EXTRACTION DES LIPIDES	23
METHODES CONVENTIONNELLES	23
A l'échelle laboratoire	23
A l'échelle industrielle	24
Inconvénients des méthodes conventionnelles	24
EXTRACTION AUX SOLVANTS DE SUBSTITUTION	24
EXTRACTION AU CO ₂ SUPERCRITIQUE	25
Alternative aux méthodes conventionnelles	25
Fluides supercritiques	25
CO ₂ supercritique comme solvant d'extraction	26
5. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	27
OXYDATION, RADICAUX LIBRES ET ANTIOXYDANTS	27
ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET SANTE	27
ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET PRODUITS AGRO-ALIMENTAIRES	28
ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES PLANTES	28
MATERIELS ET METHODES	29
1. MATERIEL VEGETAL	29
CULTURE, RECOLTE ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL	29
TENEUR EN MATIERE SECHE	29
2. EXTRACTIONS DES HUILES	29
EXTRACTION PAR L'HEXANE SELON LA METHODE DE SOXHLET	30
EXTRACTION SELON LA METHODE DE FOLCH	31
EXTRACTION AU CO ₂ SUPERCRITIQUE	32
EXTRACTION PAR UN SOLVANT ALTERNATIF SELON LA METHODE DE SOXHLET	35
3. CARACTERISATION DES HUILES	36
PROFIL EN ACIDES GRAS	36
TENEURS EN ACIDES GRAS	37
TENEUR ET PROFIL EN STEROLS	37
PROFIL EN COMPOSES PHENOLIQUES	39
Préparation d'extraits méthanoliques	39
Teneur totale en composés phénoliques par Folin-Ciocalteu	40
Profil en composés phénoliques par HPLC	40
ACTIVITE ANTI-OXYDANTE	41
4. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES RESULTATS	42
RESULTATS ET DISCUSSIONS	43
1. TENEUR EN MATIERE SECHE DES GRAINES	43
2. EXTRACTIONS DES HUILES	43
GENERALITES	43
COMPARAISON DES PLANTES	44
COMPARAISON DES METHODES D'EXTRACTION	44
3. CARACTERISATION DES HUILES	45

PROFILS EN ACIDES GRAS	45
Fenouil	45
Anis vert	48
Carvi	50
Comparaison des plantes	51
Comparaisons des méthodes d'extraction	52
TENEURS EN ACIDES GRAS	53
Fenouil	53
Anis vert	54
Carvi	54
Comparaison des plantes	54
Comparaison des méthodes d'extraction	54
TENEURS ET PROFILS EN STEROLS	55
Fenouil	55
Anis vert	58
Carvi	59
Comparaison des plantes	61
Comparaison des méthodes d'extraction	61
TENEURS ET PROFILS EN COMPOSES PHENOLIQUES	62
Teneur totale en composés phénoliques par Folin-Ciocalteu	62
Profil en composés phénoliques par HPLC	63
ACTIVITES ANTIOXYDANTES	64
Généralités	64
Comparaison des plantes	65
Comparaison des méthodes d'extraction	66
DISCUSSION GENERALE	68
1. RENDEMENTS MASSIQUES D'EXTRACTION	68
2. ACIDES GRAS	68
3. STEROLS	69
4. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	70
5. AUTRES CRITERES	70
6. INTERET A GRANDE ECHELLE	71
PERSPECTIVES	73
CONCLUSION	74
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75
ANNEXES	81

LISTES DES FIGURES, TABLEAUX, ÉQUATIONS, ANNEXES ET ABRÉVIATIONS

1. Liste des figures

Figure 1 : Structures sécrétrices de graines de carvi (x48) (Svoboda et al., 2003b)	3
Figure 2 : Planche botanique de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Thomé, 1885)	5
Figure 3 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	7
Figure 4 : Planche botanique de <i>Pimpinella anisum</i> L. (Thomé, 1885)	9
Figure 5 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de <i>Pimpinella anisum</i> L.	10
Figure 6 : Planche botanique de <i>Carum carvi</i> L. (Thomé, 1885)	12
Figure 7 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de <i>Carum carvi</i> L.	13
Figure 8 : Structure d'un triglycéride, d'après (Peter, 2008)	14
Figure 9 : Structures de l'acide pétrosélinique et oléique	15
Figure 10 : Structure des principaux stérols (Trautwein et al., 2007)	19
Figure 11 : Structure des tocophérols et tocotriénols, d'après (Colombo, 2010)	20
Figure 12 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes	22
Figure 13 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone (Budisa et al., 2014)	26
Figure 14 : Représentation de l'appareil utilisé pour les extractions au CO ₂ supercritique	33
Figure 15 : Schéma de principe simplifié de l'appareil utilisé pour les extractions au CO ₂ supercritique	34
Figure 16 : Structure de la bétuline (d'après (Winkler-Moser, n.d.))	37
Figure 17 : Rendements massiques d'extraction des huiles des différentes graines par les différentes méthodes d'extraction	43
Figure 18 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites de fenouil (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO ₂ supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane	46
Figure 19 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite d'anis vert par la méthode de Soxhlet à l'hexane	48
Figure 20 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite de carvi par la méthode de Soxhlet à l'hexane	50
Figure 21 : Profils en acides gras des différents extraits lipidiques des graines de fenouil, anis vert et carvi	51
Figure 22 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite de fenouil par la méthode de Soxhlet à l'hexane.	53
Figure 23 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits de fenouil obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO ₂ -SC et (d) Soxhlet au MeTHF	55
Figure 24 : Structure des stérols identifiés dans les huiles de fenouil (d'après (Winkler-Moser, n.d.))	56
Figure 25 : Composition en stérols des extraits de fenouil : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol et (9) Δ^7 -avenastérol	57
Figure 26 : chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés d'un extrait au CO ₂ -SC d'anis vert	58
Figure 27 : Composition en stérols des extraits d'anis vert : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5), Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol et (9) Δ^7 -avenastérol	59
Figure 28 : Chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés d'un extrait de carvi au CO ₂ -SC	59
Figure 29 : Structure du cholestérol et du cholest-7-en-3 β -ol	60
Figure 30 : Composition en stérols des extraits de carvi : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5), Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol et (9) Δ^7 -avenastérol	60
Figure 31 : Profils en stérols des différents extraits lipidiques des graines de fenouil, anis vert et carvi	62
Figure 32 : Chromatogramme de séparation des composés phénoliques d'un extrait d'huile de carvi obtenue par Soxhlet à l'hexane	63
Figure 33 : Chromatogramme de séparation des composés phénoliques du mix de standards à 0,05 mg/mL, détection à 280 nm.	63

Figure 34 : Chromatogramme de séparation des composés phénoliques de l'extrait méthanolique d'huile de carvi extraite par Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane avec 0,1 mg d'acide cinnamique (SI)	64
Figure 35 : Activités antiradicalaires des différentes graines par type d'extraction (1) Soxhlet hexane, (2) Folch, (3) CO ₂ supercritique et (4) Soxhlet 2-méthyltétrahydrofurane	65
Figure 36 : Activités antiradicalaires des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction par type de graines (1) fenouil, (2) anis vert et (3) carvi	66
Figure 37 : Procédé de valorisation des graines	72

2. Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition biochimique de la graine de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	6
Tableau 2 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. en fonction de leurs provenances	7
Tableau 3 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de <i>Pimpinella anisum</i> L. en fonction de leurs provenances	10
Tableau 4 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de <i>Carum carvi</i> L. en fonction de leurs provenances	13
Tableau 5 : Teneur en huile, acides gras totaux et acide pétrosélinique des trois graines étudiées (Placek, 1963)	15
Tableau 6 : Principales classes des composés phénoliques (Macheix et al., 2005)	21
Tableau 7 : Propriétés physiques du CO ₂ à l'état de gaz, supercritique et liquide, d'après (Herzi, 2013)	25
Tableau 8 : Propriétés chimiques et physiques du n-hexane	30
Tableau 9 : Propriétés chimiques et physiques du chloroforme	31
Tableau 10 : Propriétés chimiques et physiques du dioxyde de carbone	32
Tableau 11 : Propriétés chimiques et physiques du 2-méthyltétrahydrofurane	35
Tableau 12 : Programme de séparation des composés phénoliques par HPLC	40
Tableau 13 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites de fenouil	47
Tableau 14 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites d'anis vert	49
Tableau 15 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites de carvi	50
Tableau 16 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles de fenouil	56
Tableau 17 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles d'anis vert	58
Tableau 18 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles de carvi	60

3. Liste des équations

Équation 1 : Teneur en matière sèche	29
Équation 2 : Rendement massique d'extraction	31
Équation 3 : Concentration relative en un AG par rapport à la teneur totale en AG	37
Équation 4 : Concentration absolue en AG dans l'huile	37
Équation 5 : Concentration en stérol de l'huile	39
Équation 6 : Absorbance corrigée d'un échantillon	42
Équation 7 : Activité antiradicalaire d'un échantillon	42

4. Liste des annexes

Annexe 1 : Pictogrammes de danger CLP et leurs significations ("Pictogrammes CLP," n.d.)	81
Annexe 2 : Rendements massiques d'extraction obtenus pour les différentes graines par les différentes méthodes d'extraction	81
Annexe 3 : Chromatogramme de séparation d'EMAG d'une huile de fenouil obtenue par la méthode de Folch présentant des pics identifiés comme étant de l'anisole et du trans-anéthol	82
Annexe 4 : Gros plan sur des pics séparés d'EMAG de C18 :1 n-9 (acide pétrosélinique) et n-12 (acide oléique) issu d'un chromatogramme de séparation d'EMAG d'une huile d'anis vert obtenue par Soxhlet à l'hexane	82
Annexe 5 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites d'anis vert (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO ₂ supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane	83
Annexe 6 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites de carvi (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO ₂ supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane	84
Annexe 7 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites de fenouil	85
Annexe 8 : Teneurs en acides gras des huiles extraites de fenouil (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0	85
Annexe 9 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites d'anis vert	86
Annexe 10 : Teneurs en acides gras des huiles extraites d'anis vert (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0	86
Annexe 11 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites de carvi	87
Annexe 12 : Teneurs en acides gras des huiles extraites de carvi (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0	87
Annexe 13 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits d'anis vert obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO ₂ -SC et (d) Soxhlet au MeTHF	88
Annexe 14 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits de carvi obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO ₂ -SC et (d) Soxhlet au MeTHF	89
Annexe 15 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites de fenouil	90
Annexe 16 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites d'anis vert	90
Annexe 17 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites de carvi	90
Annexe 18 : Activité antiradicalaire des différentes graines par type d'extraction	91
Annexe 19 : Récapitulatif des tests statistiques effectués	91

5. Liste des abréviations

ACP	Acyl Carrier Protein
AGT	Acides gras totaux
APP	Amyloid Precursor Protein
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluène
CLP	Classification, Labelling, Packaging
CO ₂ -SC	Dioxyde de carbone supercritique
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EAG	Equivalent en acide gallique
EMAG	Ester(s) méthylique(s) d'acide(s) gras
GC-FID	Gas Chromatography – Flame Ionization Detector
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection
IL	Interleukines
LDL	Low Density Lipoprotein
MeTHF	2-méthyltétrahydrofurane
MWD	Multi Wavelength Detector
PAM	Plantes aromatiques et médicinales
ROS	Reactive Oxygen Species
SI	Standard interne
TNF	Tumor Necrosis Factors

INTRODUCTION

1. Les plantes aromatiques et médicinales (PAM)

Définitions

Une plante aromatique est définie par le journal « Medicinal and Aromatic Plants » comme étant une « plante qui produit et exsude des substances aromatiques ». Ces substances sont utilisées pour leurs odeurs par les industries agroalimentaire, pharmaceutique ou encore cosmétique et de parfumerie. ("Medicinal & Aromatic Plants," March-28-2017)

Une plante médicinale est une plante contenant un certain nombre de composants actifs lui conférant des propriétés thérapeutiques. Elles sont dès lors utilisées par l'homme dans le cadre de la médecine ou de son bien être. Le nombre de plantes utilisées en médecine est estimé à 70 000. (Daniel, 2006)

Les plantes aromatiques et médicinales font partie de notre quotidien. Elles sont présentes dans nos aliments, dans certaines boissons alcoolisées, médicaments, produits cosmétiques, parfums, colorants, etc. En alimentation, elles sont utilisées pour leur goût, leur couleur et leur flaveur en général, mais elles possèdent également de nombreuses propriétés, entre autres antioxydantes, antimicrobiennes, pharmaceutiques et nutritionnelles. (Peter et al., 2012)

Evolution de l'utilisation des PAM

Pendant des milliers d'années, les hommes n'avaient que les plantes pour se soigner. Celles-ci étaient utilisées aux quatre coins du monde pour soigner toutes sortes de maux. Nos ancêtres ont observé les effets, aussi bons que mauvais, provoqués par la consommation de l'une ou l'autre plante et ont transmis ce savoir de génération en génération, menant à l'identification d'un grand nombre de plantes et de leurs propriétés curatives. Le premier recueil consacré aux plantes médicinales est le papyrus égyptien Ebers daté à 1500 ACN. Au 1^{er} siècle PCN, le médecin grec Dioscoride a rédigé le premier herbier en Europe « Materia Medica » qui recense environ 600 plantes. Cet ouvrage a eu une influence considérable sur la médecine occidentale. Au Moyen Age, le développement du commerce intercontinental et les colonisations de l'Amérique centrale et du Sud ont multiplié le nombre de plantes disponibles en Europe. La médication par les plantes était alors toujours très répandue. (Iserin et al., 2001)

A partir du début du XIX^e siècle, les laboratoires de chimie ont commencé à produire des médicaments en isolant des molécules de plantes. La phytothérapie et la médecine ont alors évolué suivant des voies différentes. Toutefois, la phytothérapie restait la médecine la plus répandue dans le monde, même en Occident. Dans les années 1930, les médecins et les pharmaciens prescrivaient ou vendaient environ 90 % de produits à base de plantes. (Iserin et al., 2001)

Ce n'est que dans les années 50 que les médicaments conçus en laboratoire, synthétiques ou extraits de plantes, se sont imposés. Au plus les médicaments chimiques se développent et permettent des guérisons rapides, au plus l'opinion publique est convaincue que la phytothérapie est illusoire et dépassée. Néanmoins, la médecine conventionnelle connaît aussi des échecs, comme l'illustre le tragique exemple du Softenon. Les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. De plus, bien que la médecine moderne ait apporté des solutions aux maladies infectieuses graves, les bactéries et virus ont peu à peu développé une certaine résistance aux médicaments. Au fil des années, l'opinion publique évolue et les traitements à base de plantes reviennent au premier plan. En effet, les soins à base de plantes ont prouvé une efficacité comparable aux médicaments classiques et des effets secondaires moindres. (Iserin et al., 2001)

Actuellement, l'intérêt commercial à développer de nouveaux produits pharmaceutiques d'origine naturelle ne cesse de croître. (Peter et al., 2012) En effet, le consommateur montre de plus en plus d'intérêt envers les produits naturels. La production de formulations végétales pour la santé, autant nutritionnelles que cosmétiques, augmente, entraînant une demande industrielle de plantes aromatiques et médicinales plus importante. (Iserin et al., 2001)

De nos jours encore, quatre-vingt pourcents de la population mondiale dépend de plantes médicinales pour les soins primaires, principalement dans les pays en voie de développement. (Peter et al., 2012) Plus de cinq mille plantes à fleurs sont utilisées à des fins médicinales dans le monde. (Kooti et al., 2015) Soixante pourcents des agents anti-tumeur et anti-infectieux sont d'origine végétale. (Peter et al., 2012) Toutefois, tout comme les médicaments, les plantes médicinales doivent être employées avec précaution. (Iserin et al., 2001)

Composition phytochimique des PAM

Les propriétés bénéfiques des plantes sont dues aux composés phytochimiques qu'elles contiennent. (Kurian, 2012) En effet, la plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques grâce aux principes actifs qu'elles renferment et qui agissent directement sur l'organisme. (Iserin et al., 2001)

En plus des métabolites primaires (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les végétaux produisent également des métabolites dit « secondaires » dont les fonctions physiologiques ne sont pas toujours exactement connues, mais qui représentent pour l'homme une source importante de molécules utilisables dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques, ...). (Macheix et al., 2005) Le règne végétal regorge de sources potentielles de parfums, de saveurs, de médicaments pour la médecine traditionnelle mais aussi conventionnelle, d'additifs alimentaires, d'intermédiaires pharmaceutiques, etc. (Handa et al., 2008) Les grandes firmes pharmaceutiques le savent et investissent d'ailleurs d'importants capitaux pour trouver de nouvelles substances chimiques afin de les commercialiser. (Iserin et al., 2001) La bioprospection de ressources naturelles connaît un essor, la recherche de nouvelles molécules comme agent thérapeutique est vaste. (Peter et al., 2012)

Des travaux antérieurs menés sur les extraits de PAM ont montré l'importance de la notion de synergie. Lors de l'utilisation d'une plante entière, différentes substances agissent ensemble et sont donc plus efficaces qu'une dose équivalente d'un ou de plusieurs principes actifs. Une plante est donc un ensemble complexe pourvu de principes actifs qui ont une influence sur les différents systèmes de régulation du corps. (Iserin et al., 2001)

Huiles essentielles

L'Organisation Internationale de Normalisation définit une huile essentielle comme étant un « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques ». ("ISO 9235:2013," 2013)

Bien que le travail porte sur les huiles fixes et non les huiles essentielles, ces dernières sont brièvement abordées ici car elles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes aromatiques et médicinales et possèdent de nombreuses propriétés. (Iserin et al., 2001)

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de métabolites secondaires contenant 20 à 60 composés volatils à différentes concentrations. Ces composés sont principalement issus de deux grands groupes : les terpènes et terpénoïdes, et les composés aromatiques et aliphatiques dérivés du phénylpropane. Elles sont liquides et volatiles, limpides et rarement colorées. Elles sont caractérisées par une odeur particulière et sont solubles dans les phases lipidiques et solvants organiques. Chaque huile essentielle est caractérisée par un chémotype qui désigne la ou les molécules la (les) plus abondante(s). Ce(s) composé(s) majeur(s) définit(ssent) d'ailleurs en général les propriétés biologiques de l'huile essentielle. (Bakkali et al., 2008)

Les huiles essentielles sont reconnues comme possédant de nombreuses propriétés dont les principales sont aromatiques, antiseptiques, antimicrobiennes, analgésiques, anti-inflammatoires, etc. (Bakkali et al., 2008)

L'huile essentielle est sécrétée et stockée dans des tissus sécréteurs spécialisés. Dans le cas des graines, l'huile essentielle produite est libérée à l'intérieur de la plante, dans des espaces intercellulaires spécialisés. (Svoboda et al., 2003a) (Figure 1)

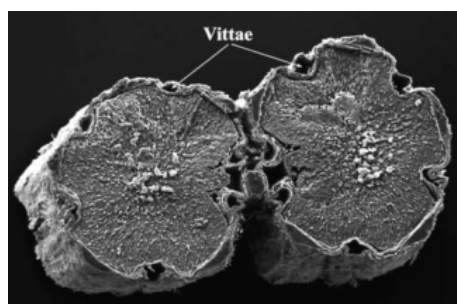


Figure 1 : Structures sécrétrices de graines de carvi (x48) (Svoboda et al., 2003b)

La composition des huiles essentielles varie en termes de proportions des différents composés selon de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Elle dépend du cultivar, de la partie de la plante, du climat, du stade de maturation au moment de la récolte (Malhotra, 2012a), de l'origine de la plante (Rather et al., 2016) , de la composition du sol. (Bakkali et al., 2008)

Composés phénoliques¹

Les composés phénoliques sont également des métabolites secondaires. Ils sont produits par les plantes dans le but de se protéger contre les prédateurs. Ils représentent une grande variété de molécules dont le point commun est la présence d'au moins un cycle aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les propriétés associées aux polyphénols sont antioxydante, anticancer et anti-inflammatoire. (Quideau et al., 2011)

¹ Une partie de la bibliographie est entièrement consacrée aux composés phénoliques (cfr p. 21-22).

Autres composés intéressants

Bien que de nombreux bienfaits soient reconnus aux huiles essentielles et aux composés phénoliques, les plantes contiennent de nombreux autres composés dignes d'attention comme les saponines, stérols, glucosides, anthraquinones, polysaccharides, substances ambrées, alcaloïdes, vitamines et minéraux, acides et résines. (Iserin et al., 2001; Peter et al., 2012)

Propriétés des PAM

Comme déjà introduit, des propriétés antioxydantes² sont attribuées aux plantes aromatiques et médicinales. Les antioxydants les plus puissants retrouvés dans les plantes sont les composés phénoliques. (Pokorný et al., 2012) Une corrélation positive a été établie entre la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante d'une plante. (Peter et al., 2012) La plupart sont des composés légèrement polaires et sont présents dans la plante sous forme de dérivés plus polaires, plus hydrophiles, les O-glycosides. (Pokorný et al., 2012) De par ce pouvoir antioxydant, les composés phénoliques sont associés à la prévention des maladies soupçonnées d'être provoquées par un stress oxydatif, comme les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, les cancers ou simplement le vieillissement. (Malhotra, 2012a; Badgujar et al., 2014; Rather et al., 2016) Les antioxydants lipophiles sont les tocophérols, retrouvés dans les graines oléagineuses. (Pokorný et al., 2012) Leur capacité anti-oxydante confèrent aux plantes une action neuroprotectrice et en font une nouvelle alternative de traitement des maladies touchant le système nerveux central (de l'épilepsie à la maladie d'Alzheimer). (Kurian, 2012)

Les composés responsables de propriétés antimicrobiennes sont les phénols simples, acides phénoliques, coumarines, terpénoïdes et alcaloïdes. (Kurian, 2012)

Les plantes aromatiques et médicinales peuvent présenter de nombreux effets bénéfiques pour la santé humaine. Elles peuvent jouer un rôle préventif contre le cancer en inhibant des effets mutagéniques et épigénétiques grâce à leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-tumeurs, d'altération de l'activité d'enzymes de biotransformation, etc. Certaines espèces de plantes permettent de réduire les risques de maladies cardiovasculaires en diminuant le niveau de cholestérol LDL (lipoprotéines de basse densité). Les plantes aromatiques et médicinales ont également un effet positif dans la lutte contre le diabète car elles possèdent des effets hypoglycémiques, elles améliorent la sensibilité de l'insuline et les défenses antioxydantes. Leurs propriétés anti-inflammatoires peuvent aussi être bénéfique dans la lutte et prévention de nombreuses maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose. Elles possèdent des propriétés intéressantes pour prévenir ou combattre l'obésité en diminuant l'appétit, l'absorption des graisses et leur déposition et en augmentant leur combustion métabolique. En effet, de nombreux composés phytochimiques peuvent influencer les sécrétions gastro-intestinales (salivaires, gastriques, biliaires et pancréatiques) et enzymes de digestion. De nombreux composés tels que le glycosides, flavonoïdes, triterpènes et phénoliques, présentent une activité hépatoprotectrice. Enfin, dans la lutte contre les maladies infectieuses, l'utilisation de plantes comme nouveaux agents antiparasitaires est très intéressante au vu des résistances que les parasites ont développées aux thérapies actuelles. (Kurian, 2012)

² Les concepts d'oxydation et activité antioxydante sont repris ultérieurement (*cfr p. 27-28*).

Fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Classification taxonomique

Le fenouil est une plante aromatique de la famille des Apiacées. D'après (Dupont et al., 2012), sa classification botanique est la suivante :

- Embranchement: Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Rosidae
- Ordre : Apiales
- Famille : Apiaceae
- Genre : *Foeniculum*
- Espèce : *vulgare* Mill.

Origine et répartition géographique

Le fenouil est une plante herbacée d'utilisation médicinale et aromatique (Kooti et al., 2015) originaire de la Méditerranée. (Badgujar et al., 2014) Aujourd'hui, il est cultivé dans de nombreuses régions d'Europe, de la Méditerranée et d'Asie. (Kooti et al., 2015)

Description botanique

Le fenouil est une plante herbacée mesurant de 1 à 2 m de hauteur. (Kooti et al., 2015) Ses feuilles peuvent atteindre 40 cm de long et sont ramifiées en très fins segments de 0,5 mm d'épaisseur. Les fleurs sont petites, de couleur jaune et disposées en ombelles (Badgujar et al., 2014). (Figure 2) Les fruits sont formés de deux akènes (Rather et al., 2016) allongés mesurant de 3 à 5 mm de long et 1,5 à 2 mm de large et présentent des nervures. Le stylopodium reste accroché au fruit. (Badgujar et al., 2014) Trois variétés de fenouil différentes ont été décrites : annuelle, bisannuelle, pérenniale. La pollinisation du fenouil est croisée. (Malhotra, 2012a)



Figure 2 : Planche botanique de *Foeniculum vulgare* Mill. (Thomé, 1885)

Composition biochimique de la graine

La graine de fenouil est constituée de moins d'un dixième d'eau. Elle est riche en glucides (mucilages, sucres et amidon), mais également en lipides et protéines. (Tableau 1) Elle renferme aussi beaucoup de fibres et minéraux, principalement du K, Na, P et Ca. (Badgujar et al., 2014) C'est également une source de vitamines A, niacine, thiamine, riboflavine (Malhotra, 2012a) et vitamine C (Rather et al., 2016).

Tableau 1 : Composition biochimique de la graine de *Foeniculum vulgare* Mill.

	Teneur (g/100 g MS)	
	Hongrie (Malhotra, 2012a)	Inde (Rather et al., 2016)
Eau	8,8	6,3
Glucides	36,6	42,3
Lipides	14,9	10
Protéines	15,8	9,5
Fibres	1,7	18,5
Minéraux	8,2	13,4
Huile essentielle	0,6 – 6	

Lipides

Les graines de fenouil contiennent 10 à 24 % d'huile (Kleiman et al., 1982; Malhotra, 2012a) qui est composée d'acides gras saturés et insaturés. Cette huile est composée majoritairement d'acide pétrosélinique³ (18:1 n-12, un isomère de l'acide oléique), qui compte pour 60 % de la composition totale en acides gras. L'acide oléique (18:1 n-9) représente 22 %, l'acide linoléique (18:2 n-6) 14 % et l'acide palmitique (16:0) 4%. (Kooti et al., 2015, Malhotra, 2012a) (Kleiman et al., 1982) attribuent même à l'acide pétrosélinique une proportion de 72,9 %, 11,0 % à l'acide linoléique, 8,7 % à l'acide oléique, 5 % à l'acide palmitique et 1,2 % à l'acide stéarique.

Huile essentielle

L'huile essentielle de la graine de fenouil contient plus de 30 composés volatils (Kooti et al., 2015) dont les principaux constituants sont le *trans*-anéthol, le fenchone, l'estragol (aussi appelé méthyl chavicol) et le δ -limonène. (Malhotra, 2012a; Badgujar et al., 2014; Rather et al., 2016) (Figure 3) L' α -pinène et le 1,8-cineole sont des exemples de composés mineurs retrouvés dans l'huile essentielle de graine de fenouil. (Rather et al., 2016)

³ L'acide pétrosélinique est un acide gras important dans la famille botanique des Apiacées. Une partie de la bibliographie y est consacrée (*cfr. p. 15-18*).

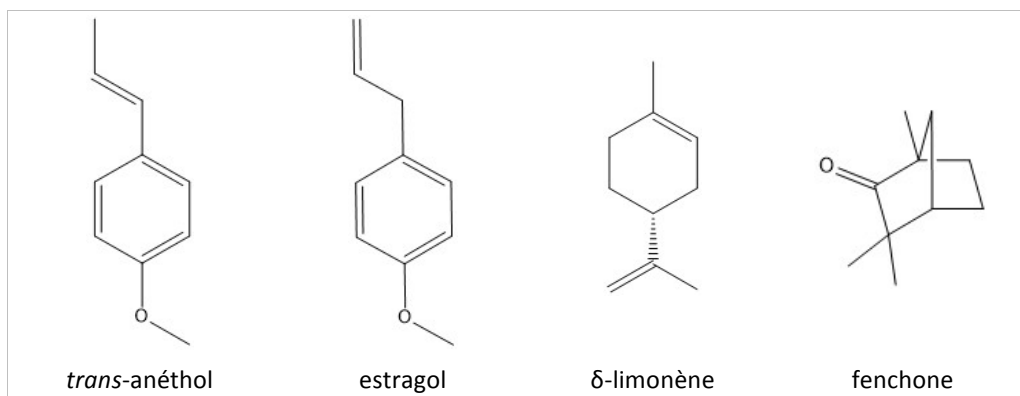


Figure 3 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de *Foeniculum vulgare* Mill.

Comme expliqué précédemment, la composition de l'huile essentielle d'une plante dépend de nombreux facteurs. Le tableau suivant (Tableau 2) présente les principaux constituants d'huiles essentielles de graines de fenouil issues de différentes origines géographiques.

Tableau 2 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en fonction de leurs provenances

	Portugal (Malhotra, 2012a)	Inde (Malhotra, 2012a)	Bangladesh (Malhotra, 2012a)	Egypt (Malhotr a, 2012a)	Chine (Badgujar et al., 2014)	Chine (Badgujar et al., 2014)
trans-anéthol	60	68	58,5	86,11	72,2	68,53
estragol	-	-	-	0,05	7,6	10,42
δ-limonène		11	19,6	0,07	3,9	6,24
fenchone	20	3,7	-	4,13	3,1	5,45

Composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée à $21,712 \pm 3,60$ mg d'équivalent en acide gallique par gramme de graines de fenouil par (Pandey et al., 2012) et à $1,651 \pm 0,114$ mg/g par (Souri et al., 2008). Les principaux composés phénoliques présents dans la graine de fenouil sont la quercétine, l'acide rosmarinique, l'apigénine, ainsi que l'acide chlorogénique, l'acide férulique-7-o-glucoside et l'acide p-coumarique en plus faibles quantités. (Badgujar et al., 2014)

Propriétés et utilisations

La plante entière est valorisable. Le large bulbe est consommé comme légume. Le fenouil est une source de fibres, qui peut aider à réduire le taux de cholestérol. Les feuilles sont aussi utilisées en cuisine, elles présentent une bonne activité antioxydante. Les graines, qui ont un goût d'anis, sont utilisées comme épice et pour en extraire l'huile essentielle. Les fleurs et feuilles sont aussi utilisées pour leur coloration jaune-brune. (Malhotra, 2012a)

Le fenouil présente de nombreux bienfaits et est utilisé pour soigner différentes pathologies, principalement gastro-intestinales, le diabète, les troubles respiratoires. Il est antioxydant, anti-inflammatoire, antiseptique. Il présente également une activité hépatoprotectrice, œstrogène, diurétique, antispasmodique, analgésique et bien d'autres encore. Au niveau digestif, le fenouil agit comme stimulant, carminatif, anti-flatulent, stomachique, antiémétique, anti-colitique et est donc utilisé contre les douleurs gastriques, les constipations et diarrhées et contre les coliques. Il présente une activité antiseptique autant contre les bactéries que les champignons, les vers ou encore les virus. Il peut être utilisé par les patients diabétiques car il est hypoglycémiant et

hypolipémiant. Le fenouil est également expectorant et est donc utilisé dans le cadre de troubles respiratoires. Son activité œstrogène favorise la sécrétion lactée des mammifères et est emménagogue. De par son action anti-inflammatoire, il est utilisé pour combattre l'arthrite. Le fenouil permet aussi dans une certaine mesure de prévenir le cancer, grâce à ses activités cytoprotectrices et anti-mutagènes. Il joue également un rôle contre l'hirsutisme, qui est le développement d'une pilosité selon un type masculin chez la femme. (Kurian, 2012; Malhotra, 2012a; Badgajar et al., 2014; Kooti et al., 2015; Rather et al., 2016)

Toxicité

L'estragol est suggéré comme étant cancérigène, l'anéthol mutagène et la quercétine clastogène, c'est-à-dire capable de causer la rupture de chromosomes. De ce fait, il est déconseillé d'utiliser l'huile essentielle à des doses trop élevées. De plus, il est préférable d'éviter le fenouil dans les remèdes médicaux pour les femmes enceintes, à cause de ses effets estrogènes. (Malhotra, 2012a)

Anis vert (*Pimpinella anisum* L.)

Classification taxonomique

L'anis vert est une plante aromatique de la famille des Apiacées. (Dupont et al., 2012) le classent comme suit :

- Embranchement: Spermatophytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Rosidae
- Ordre : Apiales
- Famille : Apiaceae
- Genre : *Pimpinella* L.
- Espèce : *anisum*

Origine et répartition géographique

L'anis vert est originaire du Moyen-Orient. Il est actuellement cultivé dans la région de l'est de la Méditerranée, dans l'ouest de l'Asie, dans le Moyen Orient et en Amérique centrale. (Shojaii et al., 2012)

Description botanique

L'anis vert (Figure 4) est une plante herbacée (Singh et al., 2008; Shojaii et al., 2012) de 30 à 50 cm de hauteur, à racine fuselée et à tiges cylindriques, finement striées et ramifiées au sommet. (Filliat, 2012). La plante entière est recouverte de poils fins. (Özgüven, 2012) Les feuilles de couleur vert pâle sont alternes. L'inflorescence est formée d'ombelles composées, comprenant de 7 à 15 rayons et dépourvues de bractées. (Filliat, 2012) Les fleurs sont petites et blanches. (Özgüven, 2012) Le fruit est un schizocarpe diakène velu de 3 à 5 mm de long. (Ghouati et al., 2012) Il est de forme ovoïde aplati sur le côté (Özgüven, 2012) et de couleur jaune-brun à vert-brun (Rocha et al., 2016) à stries claires. (Ghouati et al., 2012) *Pimpinella anisum* L. est une plante annuelle de pollinisation croisée. (Özgüven, 2012)



Figure 4 : Planche botanique de *Pimpinella anisum* L. (Thomé, 1885)

Composition biochimique de la graine

La graine d'anis vert renferme une teneur en glucides de l'ordre de 50 %, 18 % de protéines et 8 à 16 % de lipides. (Özgüven, 2012) Le rendement en huile essentielle peut varier de 1,5 à 6 % (Shojaii et al., 2012).

Lipides

Les graines d'anis vert contiennent 8 à 16 % (23,9 % selon (Kleiman et al., 1982)) d'huile contenant des acides gras saturés et insaturés. Le pourcentage des acides gras insaturés est nettement supérieur à celui des acides gras saturés. L'acide pétrosélinique est l'acide gras le plus important avec une contribution allant de 50 à 70 % de la composition totale en acides gras. D'autres acides gras sont également présents tels que l'acide oléique avec une contribution de 22 à 28 %, l'acide linoléique de 5 à 21 % et l'acide palmitique de 5 à 10 %. (Kleiman et al., 1982; Özgüven, 2012)

Outre des acides gras, la graine de carvi renferme également des triterpénoïdes et stérols, principalement de la β -amyrine et du stigmastérol respectivement. (Özgüven, 2012)

Huile essentielle

De nombreux travaux sur *Pimpinella anisum* L. ont révélé que le constituant majoritaire de son huile essentielle est le *trans*-anéthol et que le γ -himachalène et l'estragol y sont également présents mais dans des proportions moindres. (Singh et al., 2008; Ghouati et al., 2012; Shojaii et al., 2012) (Figure 5) Le *p*-anisaldéhyde, l'eugénol, le β -caryophyllène sont des exemple de composés mineurs contenus dans l'huile essentielle de la graine d'anis vert. (Ghouati et al., 2012)

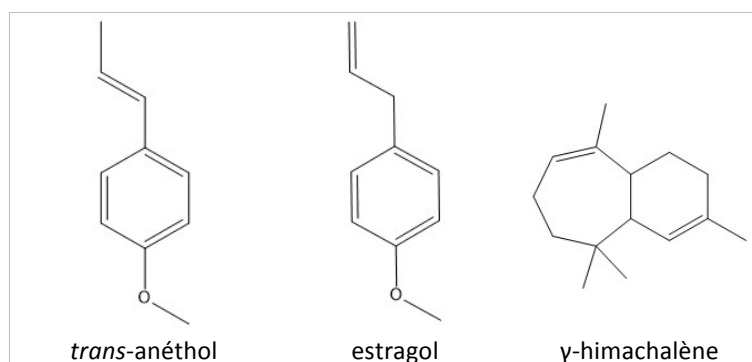


Figure 5 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de *Pimpinella anisum* L.

Les résultats repris dans le tableau ci-dessous (Tableau 3) illustrent la variation de la composition de cette huile essentielle en fonction de la provenance de la plante.

Tableau 3 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de *Pimpinella anisum* L. en fonction de leurs provenances

	Maroc (Ghouati et al., 2012)	Inde (Singh et al., 2008)	Turquie (Shojaii et al., 2012)
<i>trans</i> -anéthol	81,19	90,1	93,9
γ -himachalène	6,22	-	V
(Z)-anéthol	0,59	-	-
Estragole	0,46	2,3	2,4
<i>p</i> -anisaldéhyde	-	-	V

Composés phénoliques

(Souri et al., 2008) attribuent aux graines d'anis vert une teneur en composés phénoliques totaux de $3,539 \pm 0,016$ mg équivalent acide gallique/g. Au niveau de la composition, la graine d'anis vert contient différents flavonoïdes glycosylés tels que la quercétine-3-glucuronide, le rutoside, la lutéoline-7-glucoside, l'isoorientine, l'isovitexine, l'apigénine-7-glucoside. (Özgüven, 2012; Shojaii et al., 2012)

Propriétés et utilisations

L'anis vert est très utilisé en cuisine, cosmétique, médecine. La partie de la plante la plus valorisée est le fruit, bien que la plante entière soit parfumée. (Özgüven, 2012)

L'anis vert est antioxydant, antiseptique, agit sur le système digestif et présente bien d'autres propriétés. L'anis vert possède, outre un pouvoir antioxydant, une action contre les bactéries, les insectes, les champignons, les virus. Il agit également sur le système digestif en tant que stimulant, carminatif, antiémétique, anti-colitique et stomachique. De plus, l'anis vert présente des actions antispasmodique, expectorante, diurétique. Il montre également une action œstrogène au niveau de la sécrétion de lait, de la dysménorrhée, des bouffées de chaleur de la ménopause. Le fenouil présente aussi des actions analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique. Il intervient dans la régénération hépatique et a un effet sur le diabète en réduisant le niveau de lipides et sucres dans le sang. (Singh et al., 2008; Ghouati et al., 2012; Kurian, 2012; Özgüven, 2012; Shojaii et al., 2012; Rocha et al., 2016)

Toxicité

L'huile essentielle des graines d'anis est considérée comme étant GRAS (généralement reconnu comme sain). (Özgüven, 2012; Rocha et al., 2016) Toutefois, l'anéthol s'est révélé être mutagène au test Ames (Özgüven, 2012) et l'estragol est suggéré étant cancérigène. (Malhotra, 2012a)

Carvi (*Carum carvi* L.)

Classification taxonomique

Le carvi est une plante aromatique issue de la famille des Apiacées. Sa classification selon (Dupont et al., 2012) est la suivante :

- Embranchement: Spermaphytes
- Sous- embranchement: Angiospermes
- Classe: Dicotylédones
- Sous-classe: Rosidae
- Ordre: Apiales
- Famille: Apiaceae
- Genre: *Carum* L.
- Espèce : *carvi*

Origine et répartition géographique

Le carvi est originaire d'Europe, d'Asie occidentale et d'Afrique du Nord. Il est aujourd'hui cultivé dans plusieurs régions d'Europe, d'Afrique et d'Asie. (Rasooli et al., 2016)

Au moins 192 espèces de carvi sont connues. Parmi celles-ci, *Carum carvi* L. est la plus importante d'un point de vue économique. (Malhotra, 2012b)

Description botanique

Le carvi (Figure 6) est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle. Elle est glabre et mesure 30 à 100 cm de hauteur. (Khan et al., 2016a) Sa racine est pivotante, en fuseau, charnue et odorante alors que sa tige est sillonnée, anguleuse et ramifiée dès la base. (Avry et al., 2003) Ses feuilles sont finement découpées et les fleurs, petites et blanches, roses (Rasooli et al., 2016) ou encore rouges (Khan et al., 2016a) sont disposées en ombelles. Le fruit est un schizocarpe qui se sépare en deux akènes. (Rasooli et al., 2016) Les akènes ont une forme de croissant d'environ 2 à 5 mm de long. (Khan et al., 2016a; Rasooli et al., 2016) Ils sont dorsalement compressés, linéaires oblongs et courbés (Khan et al., 2016a) et présentent cinq stries. (Rasooli et al., 2016) Le carvi est une plante de pollinisation croisée et de nombre de chromosomes somatiques $2n = 20$. (Malhotra, 2012b)



Figure 6 : Planche botanique de *Carum carvi* L. (Thomé, 1885)

Composition biochimique de la graine

La graine de carvi renferme une teneur en eau de 9,87 %. Elle contient 49,90 % de glucides, 19,77 % de protéines et 14,59 % de lipides (19,4 % selon (Kleiman et al., 1982)) et est également riche en fibres, en minéraux et en acide ascorbique. La teneur en huile essentielle peut varier de 1 à 9 %. (Khan et al., 2016a)

Lipides

La graine de carvi renferme entre 15 à 19 % d'huile fixe (Kleiman et al., 1982; Khan et al., 2016a). La composition en acides gras libres de la graine de carvi est caractérisée par la dominance de l'acide pétrosélinique comptant pour 30 à 43 % de la composition totale en acides gras, et l'acide linoléique, comptant pour 34 à 37 %. Les acides oléique, palmitique et stéarique sont également présents avec des teneurs allant de 15 à 25 %, 4 à 5 % et environ 1 % respectivement. (Kleiman et al., 1982; Khan et al., 2016a)

Le β -sitostérol et le stigmastérol sont les stérols majoritaires (35-40 %). D'autres stérols sont présents en quantités mineures tels que le cholestérol, le brassicastérol, le campestérol et le Δ^7 -campestérol, le Δ^7 -stigmastérol, le Δ^5 - et le Δ^7 -avénastérols. (Zlatanov et al., 1995)

Huile essentielle

Le composant majoritaire de l'huile essentielle des graines de carvi est le δ -carvone (45 – 95 %), suivi par le δ -limonène (1,5 – 51 %). (Figure 7) (Malhotra, 2012b; Agrahari et al., 2014; Khan et al., 2016b; Rasooli et al., 2016) D'autres composés mineurs sont présents comme l' α -pinène, le linalool, le γ -terpinène, le ρ -cymène, le carvacrol, carvenone, etc. (Agrahari et al., 2014)

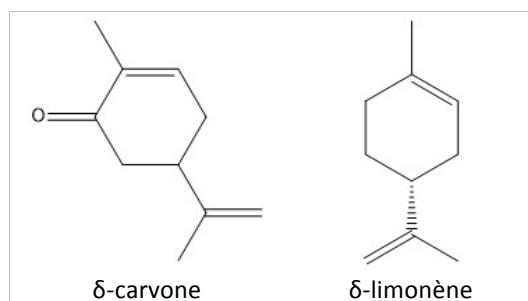


Figure 7 : Composés majeurs de l'huile essentielle de graines de *Carum carvi* L.

Les valeurs reprises dans le tableau 4 montrent la variation de la composition d'huiles essentielles de graines de carvi en fonction de la provenance de la plante.

Tableau 4 : Variation de la composition d'huiles essentielles de graines de *Carum carvi* L. en fonction de leurs provenances

	Norvège (Malhotra, 2012b)	Tunisie (Malhotra, 2012b)	Iran (Malhotra, 2012b)	Inde (Malhotra, 2012b)
δ -carvone	57–77	76,78–80,53	44,5–95,9	50 – 65
δ -limonène	26–41	13,05–20,29	1,5–51,3	45

Composés phénoliques

(Pandey et al., 2012) rapportent une teneur totale en composés phénoliques de $35,445 \pm 1,84$ mg d'équivalent en acide gallique par gramme de graines de carvi. Les flavonoïdes présents dans les graines de carvi sont la quercétine et le kaempférol qui sont surtout présents sous la forme de 3-O-glycosides. (Malhotra, 2012b; Khan et al., 2016b) Les coumarines identifiées sont l'ombelliférone, la coumarine et le scopolétole. (Malhotra, 2012b) Les graines contiennent également des acides phénoliques tel que l'acide caféique (Khan et al., 2016a) et des tanins. (Malhotra, 2012b)

Propriétés et utilisations

Le carvi est traditionnellement utilisé comme condiment ou épice grâce à sa flaveur. (Rasooli et al., 2016) De nombreuses propriétés lui sont attribuées, tel qu'un pouvoir antioxydant, antiseptique, des effets sur le système digestif, sur le foie, le diabète, etc. Le carvi montre un pouvoir antioxydant important. Il peut également être utilisé dans la lutte contre les bactéries, champignons, insectes, virus, vers, mollusques. Il présente de nombreuses propriétés intervenant au niveau digestif : carminatif, anti-flatulent, stomachique. Il est donc utilisé pour traiter les indigestions, coliques, etc. Une activité antispasmodique lui est reconnue. Il est hypoglycémiant et hypolipémiant et peut donc jouer un rôle dans la lutte contre le diabète. Il est également anti-inflammatoire, chimiopréventif et antiprolifératif. Il présente une activité diurétique, hépatoprotectrice, diurétique, analgésique, mais également anti-stress, anti-ulcère, sédative et anesthésique. (Kurian, 2012; Malhotra, 2012b; Agrahari et al., 2014; Khan et al., 2016a; Rasooli et al., 2016)

Toxicité

Le carvi et les produits qui en dérivent ne semblent pas présenter de toxicité pour l'être humain. Toutefois, à dose très élevée, il peut causer l'avortement ou être neurotoxique. Des doses trop élevées sur de longues périodes peuvent également engendrer des dégâts aux reins et au foie. (Malhotra, 2012b)

2. Matière grasse végétale

Beaucoup de recherches ont été menées sur la composition et les activités biologiques des huiles essentielles et des fractions phénoliques. Cependant, peu d'études ont abordé les activités biologiques de la fraction lipidique des plantes aromatiques et médicinales.

Les lipides consistent en un large groupe de composés chimiquement hétérogènes (Leger, 2010) mais qui présentent tous la propriété d'être insoluble dans l'eau et soluble dans des solvants organiques non polaires (Johnson et al., 2009; Leger, 2010). Ils ont une densité inférieure à celle de l'eau. (Johnson et al., 2009)

Les huiles végétales brutes contiennent principalement des triglycérides, mais aussi des acides gras libres, mono- et diglycérides. Elles contiennent également des phospholipides, des stérols (Gunstone, 2005; Gornay, 2006; Johnson et al., 2009), des alcools gras (Gornay, 2006; Johnson et al., 2009) et triterpéniques (Gunstone, 2005; Gornay, 2006), des tocophérols (Gornay, 2006) et tocotriénols (Gunstone, 2005), des hydrocarbures, carotènes, chlorophylles (Gunstone, 2005; Gornay, 2006), des vitamines liposolubles (Johnson et al., 2009) et d'autres substances encore. (Gunstone, 2005; Johnson et al., 2009) Les constituants principaux sont abordés ci-dessous.

Glycérides et acides gras

Généralités

Les glycérides sont composés de molécules d'acides gras estérifiées sur une molécule de glycérol. Les triglycérides sont des glycérols auxquels sont fixées trois chaînes d'acides gras. (Figure 8) Lorsque deux acides gras seulement sont greffés, un diglycéride est formé, et dans le cas d'un seul acide gras fixé, un monoglycéride. (Leger, 2010) Dans la plante, les triglycérides servent principalement de composés de stockage. (Buchanan et al., 2015)

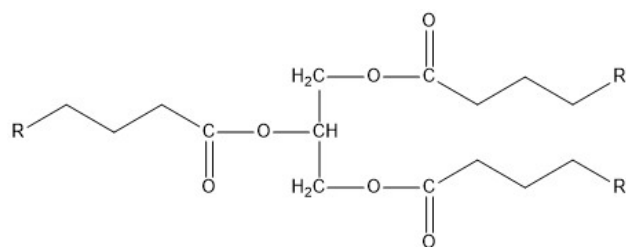


Figure 8 : Structure d'un triglycéride, d'après (Peter, 2008)

Les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides. Ils peuvent être présent estérifiés à un squelette glycérol ou libres. (Peter, 2008) Ils sont composés uniquement d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. (Leger, 2010) Ce sont des acides organiques faibles formés d'une chaîne hydrocarbonée se terminant d'un côté par un groupement méthyl et de l'autre par un groupement carboxyle. Ils diffèrent les uns des autres par le nombre de carbone dont se compose cette chaîne (Peter, 2008), généralement entre 4 et 30 (Gornay, 2006), le nombre d'insaturations (doubles liaisons) et les positions de ces dernières. (Peter, 2008)

Acide pétrosélinique

Généralités

Le composé majeur de l'huile des graines d'Apiacées est l'acide pétrosélinique, C18:1 n-12 ou C18:1 Δ6. Cet acide gras non usuel est un isomère de l'acide oléique (C18:1 n-9 ou C18:1 Δ9) duquel il diffère par la position de la double liaison. (Figure 9) Il représente la majorité de la composition totale en acides gras des graines de cette famille. (Kleiman et al., 1982) (Tableau 5)

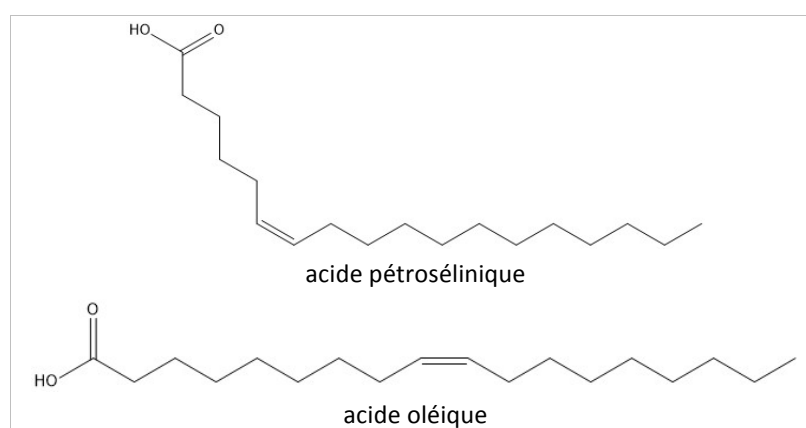


Figure 9 : Structures de l'acide pétrosélinique et oléique

Tableau 5 : Teneur en huile, acides gras totaux et acide pétrosélinique des trois graines étudiées (Placek, 1963)

	Teneur en huile des graines (%)	Teneur en acides gras totaux de l'huile (%)	Teneur en acide pétrosélinique (% acides gras totaux)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	16,5	54,5	86
<i>Carum carvi</i> L.	9,0		26
<i>Pimpinella anise</i> L.	23,5	88,0	17,5

Voie métabolique

La raison pour laquelle cet acide gras n'est pas courant et est caractéristique de quelques familles botaniques uniquement réside dans la façon dont ce dernier est produit dans ces plantes. (Cahoon et al., 1992; Ohlrogge, 1994) ont mené de nombreux travaux visant à élucider la voie métabolique de l'acide pétrosélinique dans les graines de coriandre, une plante appartenant à la famille des Apiacées.

Comme pour la synthèse de tout acide gras, les premières étapes sont la transformation de molécules d'acétyl coenzyme A en malonyl coenzyme A pour ensuite former du butyryl-ACP (C4:0-ACP), et les élongations de la chaîne carbonée par plusieurs interventions d'enzymes 3-

cétoacyl-ACP-synthases. Ces réactions prennent place dans les plastes. Ensuite, leurs recherches ont montré que l'acide pétrosélinique n'est pas formé par désaturation de l'acide stéarique (C18:0), comme il pourrait être intuitif de le penser. L'introduction de la double liaison se fait sur le palmitoyl-ACP, autrement dit la chaîne carbonée d'acide palmitique lorsqu'elle est encore estérifiée à une protéine porteuse d'acyle (acyl carrier protien) dans le plaste. Trois enzymes sont ensuite impliquées dans la synthèse de l'acide pétrosélinique à partir de palmitoyl-ACP. Premièrement, la palmitoyl-ACP Δ^4 désaturase, une acyl-ACP désaturase spécifique, introduit une double liaison en position Δ^4 . Ensuite, une 3-cétoacyl-ACP synthase spécifique permet l'élongation du Δ^4 -hexadecenoyl-ACP en pétroselinoyl-ACP. Ce dernier sera enfin clivé par la pétroselinoyl-ACP thioestérase, une acyl-ACP thioestérase spécifique, libérant l'acide gras de la protéine ACP afin qu'il puisse sortir du plaste et être incorporé dans des triglycérides. L'explication de la présence d'acide pétrosélinique dans certaines plantes se justifie donc par la présence de ces trois enzymes.

Propriétés et intérêts

Propriétés technofonctionnelles

La seule différence de position de la double liaison entre l'acide pétrosélinique et l'acide oléique engendre une structure différente de l'acide gras, conduisant à une augmentation de son point de fusion. Alors que l'acide oléique fond à une température de 12 °C, l'acide pétrosélinique ne fond qu'à une température de 33 °C. Cette propriété est intéressante pour l'industrie des margarines pour la production d'huiles végétales insaturées solides à température ambiante. (Ohlrogge, 1994)

Réduction de l'absorption lipidique

Les huiles riches en acide pétrosélinique constituent une alternative « low-fat » aux huiles végétales conventionnelles. En effet, (Heimermann et al., 1973) ont montré que la lipolyse de triglycérides d'acide pétrosélinique par les lipases pancréatiques était moins efficace que pour ceux d'acide oléique. Cela résulte en une absorption plus faible de cet acide gras.

(Alaluf et al., 2002) ont déposé un brevet pour des formulations contenant de l'acide pétrosélinique pouvant être utilisées comme substituant de matière grasse habituelle. Les huiles riches en acide pétrosélinique présentent de bonnes propriétés structurales mais n'engendrent pas d'augmentation du cholestérol LDL dans le sang.

Activité anti-inflammatoire

L'acide pétrosélinique est déjà utilisé dans différentes formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques pour son activité anti-inflammatoire. Les explications de cette activité diffèrent dans les différentes publications et brevets.

Avant tout, il est utile d'introduire la réaction inflammatoire. L'inflammation est une réponse normale de l'organisme à une infection, une allergie, une plaie, une maladie auto-immune, une exposition à des radiations, à des agents irritants, etc. (Malnoe et al., 1999) Elle est caractérisée par l'apparition de rougeur, gonflement, chaleur et douleur. Ces caractéristiques sont dues à un flux sanguin amplifié, à une perméabilité des capillaires sanguins plus élevée permettant le passage de grosses molécules du sang vers les parois endothéliales, et au mouvement accéléré des leucocytes vers les tissus environnants. L'inflammation enclenche de cette façon les processus immunitaires liés à la destruction du pathogène ou des toxines étrangères, au nettoyage des débris cellulaires et à la réparation des tissus abimés. Pour cela, les granulocytes,

monocytes, macrophages et leucocytes sont attirés sur le site d'inflammation. Ils sont activés par des endotoxines, ou lipopolysaccharides, présentes sur la paroi des bactéries Gram négatives et forment alors des cytokines (comme les facteurs de nécrose tumorale TNF, interleukines IL, etc), eicosanoïdes (dérivés de l'acide arachidonique), ROS (Reactive Oxygen Species, autrement dit espèces réactives oxygénées), monoxyde d'azote, et autres médiateurs. Bien que la réaction d'inflammation soit une réponse normale de l'organisme, une inflammation excessive ou inappropriée contribue à des dégâts tissulaires et à un panel de maladies aiguës et chroniques. En plus des maladies inflammatoires classiques, l'inflammation joue également un rôle dans les troubles cardiovasculaires et neurodégénératifs liés au vieillissement. (Calder, 2006) C'est dans ce cadre que la recherche d'agents anti-inflammatoires est intéressante.

La consommation d'huiles riches en acide pétrosélinique semble avoir des effets inhibiteurs sur la synthèse d'acide arachidonique (précurseur des eicosanoïdes, médiateurs d'inflammation). Lors de leurs travaux, (Weber et al., 1997) ont nourris des rats à l'aide d'une huile de coriandre riche en acide pétrosélinique d'une part, et d'une huile de tournesol riche en acide oléique d'autre part, pour ensuite observer la composition en acides gras de leurs foies. Les résultats obtenus indiquent que les taux en acide linoléique (C18:2 n-6) sont plus élevés dans les foies des rats nourris à l'huile de coriandre alors que les taux en acide arachidonique (C20:4 n-6) y sont presque réduits de moitié. Ils en ont déduit que l'acide pétrosélinique est un métabolite « dead-end » (autrement dit sans issue, « cul-de-sac ») de la voie métabolique de désaturation et élongation de chaîne transformant l'acide linoléique en acide arachidonique qui forme ensuite des eicosanoïdes. Ils ont suggéré que l'acide pétrosélinique, avec sa double liaison Δ^6 , imite un produit de la Δ^6 désaturase, inhibant l'enzyme de cette façon.

(Alaluf et al., 2002) ont déposé un brevet pour des formulations à base d'acide pétrosélinique pouvant être utilisées en tant qu'additif alimentaire ayant une action anti-inflammatoire. Ils expliquent l'action anti-inflammatoire de l'acide pétrosélinique par son inhibition de la formation de métabolites d'acide arachidonique.

(Malnoe et al., 1999) ont déposé un brevet pour « une composition alimentaire, cosmétique et/ou pharmaceutique contenant de l'acide pétrosélinique destinée à activer la β -oxydation peroxisomale des acides gras dans les tissus superficiels d'un mammifère de sorte à pouvoir traiter ou prévenir les inflammation et/ou moduler le métabolisme des lipides des tissus superficiels ». Dans les cellules du foie, activer les peroxysomes permet d'augmenter la dégradation du leucotriène B_4 , un eicosanoïde, et de cette façon contrôler la réaction inflammatoire. Cependant, dans les tissus superficiels, l'effet anti-inflammatoire et/ou modulateur du métabolisme des lipides n'est pas expliqué dans ce brevet.

Autres bienfaits

L'acide pétrosélinique est également utilisé dans des compositions cosmétiques ou dermatologiques pour ses propriétés hydratantes. En effet, (Laugier et al., 1998) ont déposé un brevet pour la préparation d'une composition destinée au traitement thérapeutique de la peau sèche. Des mesures *in vitro* de pouvoir hydratant ont été effectuées mais le brevet n'aborde pas les mécanismes d'action de l'acide pétrosélinique.

(Alaluf et al., 2002) reconnaît également à l'acide pétrosélinique un effet anti-âge car il booste le niveau de deux protéines structurales de la peau : le collagène et la décorine. De cette façon, il a un impact positif sur les rides, la peau sèche abimée par les rayons lumineux, les taches de vieillissement, etc.

L'acide pétrosélinique présente également une activité antimicrobienne considérable contre certaines bactéries et levures. (Placek, 1963)

Intérêt industriel

Au niveau industriel, l'acide pétrosélinique est intéressant grâce à sa structure particulière. Cet acide gras de dix-huit atomes de carbone présentant une double liaison en position Δ^6 offre la possibilité de produire des dérivés chimiques intéressants. En effet, le clivage oxydatif, par ozonolyse par exemple, de l'acide gras libre de l'acide laurique (C12:0) et de l'acide adipique (C6:0 dicarboxylique) (Kleiman et al., 1982; Cahoon et al., 1992), alors que l'acide oléique fournit de l'acide nonanoïque et azélaïque. (Placek, 1963) L'acide laurique est utilisé dans la fabrication de savons, shampoings et autre produits cosmétiques, détergents et surfactants (Friedt et al., 1995) C'est également l'acide gras insaturé présentant la plus forte activité antimicrobienne contre les bactéries gram positives, les virus et les champignons. (Dayrit, 2015) L'acide adipique est le monomère constituant le nylon 66. (Cahoon et al., 1992)

Production

Des travaux visant à isoler et purifier l'acide pétrosélinique d'huiles végétales à fortes teneurs en cet acide gras furent effectués dès les années 20. En 1927, (Van Loon, 1927) a effectué des travaux sur des huiles de persil pour en extraire l'acide pétrosélinique par de nombreuses et fastidieuses étapes de séparations, de cristallisation et de distillation fractionnée des acides gras. En 1959, Shenolikar et Subbaram fractionnaient les acides gras par formation de complexes d'inclusion avec l'urée. Cependant, l'acide pétrosélinique obtenu de cette manière était impur. (Chobanov et al., 1966) Les méthodes furent encore modifiées et améliorées lors de divers travaux, entre autre par (Fore et al., 1960) et (Chobanov et al., 1966), mais restent toujours fastidieuses. Des travaux ont également été menés sur des plantes transgéniques dans le but d'obtenir des cultures industrielles permettant la production de grandes quantités d'acides gras non usuels, comme l'acide pétrosélinique par exemple. (Murphy et al., 1994; Ohlrogge, 1994)

En 1952, une méthode de production synthétique d'acide pétrosélinique a été créée par (Lumb et al., 1952). Celle-ci consiste en la réduction partielle d'acide taririque (acide octadéc-6-ynoïque), cet acide gras acétylénique étant préalablement obtenu à partir de tridecynyl-lithium et du 1-chloro-3-iodopropane au travers de différentes étapes.

L'obtention de molécules d'acide pétrosélinique pures et compliquée et présente des coûts très élevés. (Placek, 1963) Cependant, toutes les applications ne nécessitant pas l'utilisation d'acide pétrosélinique sous forme pure, il reste tout à fait pertinent de s'intéresser à des huiles qui en contiennent de fortes teneurs.

Phospholipides

Les phospholipides, comprenant les phosphoglycérides aussi appelés phosphatides, représentent la classe majeure des lipides polaires. (Peter, 2008) Leur structure est semblable à celle des triglycérides. Sur la molécule de glycérol sont greffés deux acides gras et un groupement phosphate chargé négativement et couplé à un autre composé hydrophile. (Leger, 2010)

Ils font partie de la fraction insaponifiable de l'huile (Peter, 2008) et ont un rôle biologique crucial car ce sont les constituants majeurs des membranes cellulaires (Peter, 2008).

Stérols

Le terme phytostérol fait référence à plus de deux cent composés différents qui ressemblent au cholestérol non seulement par leurs structures mais aussi par leurs fonctions biologiques. (Trautwein et al., 2007; Rafia, 2013)

Les stérols sont tous composés d'un noyau stérane, un groupement hydroxyle au carbone 3 à la position b et une double liaison, généralement localisée entre les carbones 5 et 6 du cycle B. Les différences majeures se situent au niveau des chaînes alkyles. (Trautwein et al., 2007) Les phytostérols les plus répandus sont le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol. (Gunstone, 2005; Johnson et al., 2009) (Figure 10) Les stanols sont les formes saturées des stérols, qui ne possèdent pas de double liaison au niveau du noyau stérane ni de la chaîne alkyle. (Trautwein et al., 2007) Les stérols font partie de la fraction insaponifiable de l'huile. (Gunstone, 2005; Gornay, 2006) Ils peuvent être présents sous forme libre ou estérifiés. (Gunstone, 2005)

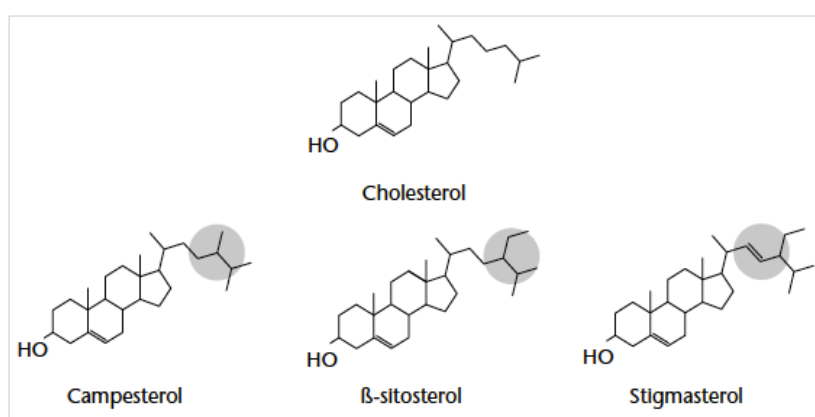


Figure 10 : Structure des principaux stérols (Trautwein et al., 2007)

Les phytostérols sont présents dans les parties riches en lipides et en fibres des plantes. Ce sont des composants structuraux des membranes cellulaires dont ils régulent la fluidité et la perméabilité. Ils interviennent également dans divers processus métaboliques associés aux membranes. (Trautwein et al., 2007)

Les stérols végétaux possèdent plusieurs propriétés bioactives. Malgré leur ressemblance structurale avec le cholestérol, ils sont absorbés à moins de 2 % par les intestins, alors que le cholestérol l'est à 30 à 60 %. Ils réduisent de cette façon le taux de cholestérol LDL (lipoprotéine de basse densité) dans le sang. (Trautwein et al., 2007; Rafia, 2013) Ils peuvent de cette façon diminuer le risque de maladies cardiovasculaires. (Uddin et al., 2014) Ensuite, ils sont reconnus comme possédant des effets protecteurs contre divers types de cancers (colorectal, sein, prostate). (Trautwein et al., 2007; Rafia, 2013) En effet, ils présentent une certaine toxicité envers les cellules tumorales dans le cas du cancer du sein et du colon et des études épidémiologiques ont suggéré qu'une alimentation riche en phytostérol réduit les cancers des poumons, estomac, colon, sein et prostate. (Uddin et al., 2014) Ils présentent également des activités anti-inflammatoire, antiathérogène et stimulant le système immunitaire. (Trautwein et al., 2007; Rafia, 2013) Leurs aspects bénéfiques sont tellement reconnus qu'il existe des aliments enrichis en phytostérols. (Rafia, 2013)

Tocophérols

Les tocophérols et les tocotriénols forment une famille de huit molécules composées d'un cycle chromanol et d'une chaîne latérale aliphatique. Les tocophérols contiennent des chaînes saturées et les tocotriénols insaturées. Au sein de chaque groupe, il existe quatre isoformes, différant par la position du ou des groupement(s) méthyl(s) sur le cycle chromanol (Tucker et al., 2005) : α (5,7,8-triméthyl), β (5,7- diméthyl), γ (7,8-diméthyl), and δ (8-méthyl). (Gunstone, 2005) (Figure 11, R¹ sur C5 et R² sur C6) Les tocophérols sont inclus dans la partie insaponifiable des lipides. (Gunstone, 2005; Gornay, 2006)

Les tocophérols et tocotriénols sont de puissants antioxydants. (Gunstone, 2005; Tucker et al., 2005; Johnson et al., 2009) Ils sont sensibles à l'oxygène et sont plus stables sous forme estérifiée. (Gunstone, 2005) Dans la plante, les tocophérols protègent les membranes contre les dommages causés par les radicaux libres. (Buchanan et al., 2015) Dans l'alimentation, ils sont une source de vitamine E qui est un nutriment essentiel. (Johnson et al., 2009)

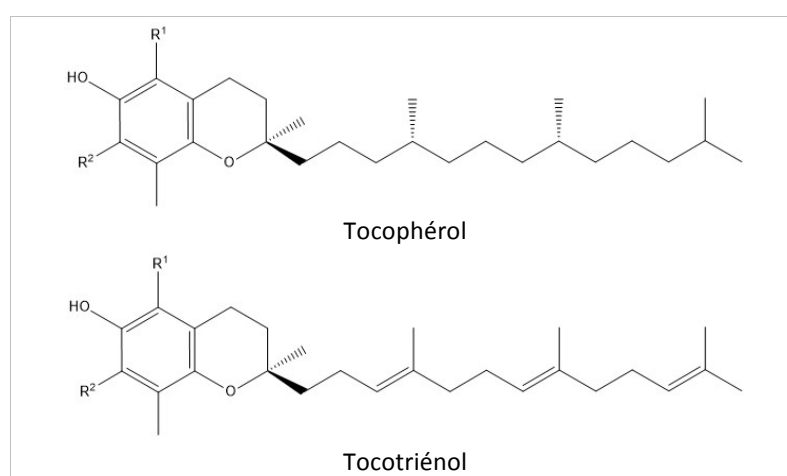


Figure 11 : Structure des tocophérols et tocotriénols, d'après (Colombo, 2010)

Autres composés lipidiques

Les huiles végétales contiennent encore bien d'autres composés tels que des sphingolipides, qui sont des lipides polaires constitués d'un groupement aminé (Peter, 2008), des alcools gras (Johnson et al., 2009) ou encore des hydrocarbures qui peuvent être des alcènes, comme le squalène et les caroténoïdes, ou des hydrocarbure polycycliques aromatiques. (Gunstone, 2005) Les hydrocarbures et alcools gras font partie de la fraction insaponifiable de l'huile. (Gunstone, 2005; Gornay, 2006)

3. Composés phénoliques

Définition

Les composés phénoliques ne font pas partie de la fraction lipidique. Ce sont des métabolites secondaires dérivés des voies de biosynthèse du pentose phosphate, shikimate et phénylpropanoïde. Ils représentent un des groupes les plus largement présents dans les plantes et ne compte pas moins de huit milles composés différents. (Balasundram et al., 2006) Ils constituent un groupe très diversifié, mais sont tous caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. (Macheix et al., 2005) Ils peuvent être des molécules phénoliques simples jusqu'à des composés hautement polymérisés. (Balasundram et al., 2006)

A l'état naturel, les composés phénoliques peuvent être conjugués à d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires, composés phénoliques ou pas). (Macheix et al., 2005) La plupart sont d'ailleurs présents dans la plante sous forme de O-glycosides qui sont des dérivés plus polaires, plus hydrophiles. (Pokorný et al., 2012)

Classification

Sur base de leurs structures très diversifiées, les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes en fonction de la complexité du squelette de base (d'un simple C₆ à des formes très polymérisées). (Tableau 6) Les composés se distinguent ensuite par le degré de modification de ce squelette par oxydation, hydroxylation, méthylation, etc. (Macheix et al., 2005)

Tableau 6 : Principales classes des composés phénoliques (Macheix et al., 2005)

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoliques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acides caféique, férulique
	Coumarines	Scopolétine, esculétine
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
	• Flavonols	Kaempférol, quercétine
	• Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine
	• Flavanols	Catéchine
	• Flavanones	Naringénine
	Isoflavonoïdes	Daidzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₁₅) _n	Tanins	

Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont composés de deux sous-groupes : les acides hydrobenzoïques et hydrocinnamiques. Les acides hydrobenzoïques présentent une structure C₆-C₁. A titre d'exemple, l'acide gallique, *p*-hydrobenzoïque et salicylique peuvent être cités. Les acides hydroxycinnamiques portent une chaîne latérale plus longue (C₆-C₃). Les acides caféique, férulique, *p*-coumarique et sinapique sont des acides hydroxycinnamiques. (Balasundram et al., 2006)

Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large de composés phénoliques au sein du règne végétal. Ils représentent plus de la moitié des composés phénoliques retrouvés dans les plantes. (Balasundram et al., 2006)

Les flavonoïdes sont des molécules de poids moléculaires relativement faibles. Ils comportent 15 atomes de carbone arrangés en configuration C₆-C₃-C₆, c'est-à-dire deux cycles aromatiques A et B reliés par 3 carbone, habituellement sous forme de cycle hétérocyclique C. (Balasundram et al., 2006) (Figure 12) Les substituants liés au cycle C permettent de séparer les flavonoïdes en différentes classes (flavonols, flavones, flavanones, flavanols, etc) tandis que les substituants sur les cycles A et B permettent de distinguer différents composés au sein d'une même classe. Les substitutions peuvent être des oxygénations, alkylations, glycosylations, acylations ou sulfations. (Balasundram et al., 2006)

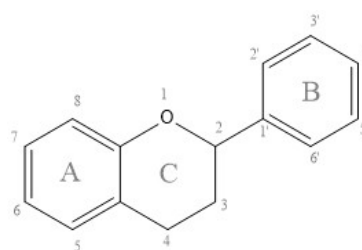


Figure 12 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes

Tanins

Les tanins sont des composés de poids moléculaires plus élevés. (Balasundram et al., 2006) Ils sont séparés en deux grands groupes selon leur composition et leur réactivité chimique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. (Macheix et al., 2005) Ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits. (Balasundram et al., 2006)

Propriétés

Les composés phénoliques interviennent dans certains aspects de la physiologie de la plante comme la lignification, la régulation de la croissance et les interactions qu'elle a avec son environnement. (Macheix et al., 2005) Ils fournissent une protection contre les pathogènes et prédateurs. Ils contribuent également à la couleur et aux caractéristiques sensorielles de certains organes de la plante. (Balasundram et al., 2006)

La principale activité attribuée aux composés phénoliques est antioxydante. Ils sont toutefois reconnus et utilisés pour de nombreuses autres propriétés : antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-allergène, antiathérogène, anti-thrombotique, cardioprotectrice et vasodilatatrice. (Balasundram et al., 2006)

4. Extraction des lipides

Méthodes conventionnelles

A l'échelle laboratoire

A l'échelle du laboratoire, différentes méthodes sont utilisées pour extraire les lipides de diverses matrices. Cela requiert généralement l'utilisation de solvants organiques tels que l'hexane, le chloroforme, l'éther de pétrole, etc. (Abert Vian et al., 2013) L'extraction solide-liquide par solvant est la méthode la plus utilisée. Elle consiste en un transfert de masse des principes actifs solubles vers le solvant. Cela se fait selon un gradient de concentration, jusqu'à ce que la concentration en principe actif dans la matrice solide et dans le solvant soient égales. En chauffant le solvant, la solubilité dans celui-ci est améliorée, favorisant donc le transfert de masse. En remplaçant le solvant à l'équilibre par du solvant frais, c'est le gradient de concentration qui est modifié. Ces paramètres donnent lieu à différents types d'extraction. (Handa et al., 2008)

Pour la méthode de Soxhlet, le solvant est chauffé, l'extraction est continue et le solvant en contact avec l'échantillon est renouvelé. Cette méthode permet d'extraire avec des plus petites quantité de solvants que les dispositifs à contre courant par exemple. (Handa et al., 2008)

La méthode de Folch repose sur la macération à froid de la matrice solide dans un mélange de solvants apolaire et plus polaire, dans lesquels se partitionnent les molécules de l'échantillon en fonction de leur polarité. (Folch et al., 1957)

L'extraction par solvant peut être améliorée par l'utilisation d'ultrasons. Ces derniers augmentent la perméabilité des parois cellulaires et produit des cavitations. Cependant, l'énergie importante des ultrasons peut causer la formation de radicaux libres dans l'huile. De plus, l'application de cette méthode à grande échelle est limitée par son coût élevé. (Handa et al., 2008)

Les méthodes d'extraction assistées par micro-onde permettent une isolation des lipides plus efficace en irradiant le mélange échantillon/solvant. Les extractions sont alors plus rapides, moins coûteuses et nécessitent de plus faibles volumes de solvant. Toutefois, l'énergie des micro-ondes peut engendrer des réactions d'oxydation et des modifications du profil en acides gras. De plus, cette méthode est appropriée pour les échantillons présentant une haute teneur en lipides uniquement. Jusqu'ici, peu d'études ont été menées sur l'extraction de lipides par micro-ondes. (Handa et al., 2008)

L'extraction d'huile peut également se faire de manière mécanique, mais le recouvrement en huile est bien plus faible. Le pressage libère généralement un tiers de l'huile contenue dans les graines. La partie solide, appelée tourteaux, contient alors encore deux tiers de l'huile contenue initialement dans les graines. (Shahidi, 2013)

A l'échelle industrielle

En ce qui concerne l'extraction de lipides à grande échelle, le procédé industriel utilisé pour l'extraction des huiles oléagineuses n'a pas énormément évolué depuis une cinquantaine d'années. (Fine et al., 2013) Celui-ci suit différentes étapes dont un prétraitement des graines, un pressage mécanique et une extraction finale à l'hexane. (Parmentier et al., 2004) Le prétraitement des graines consiste en un nettoyage et décorticage mais également en un traitement thermique. La majeure partie de l'huile est extraite des graines par pression, laissant un tourteau, appelé « gâteau de compression », contenant encore 16 à 24 % de matières grasses en fonction de la nature des graines. Cette huile résiduelle est récupérée par extraction continue à l'aide d'hexane qui est ensuite évaporé par distillation. L'extraction à l'hexane permet d'obtenir un rendement d'extraction de 97 %, alors qu'il ne dépasse pas les 89 % par simple extraction mécanique. (Fine et al., 2013) L'huile obtenue est trouble, instable chimiquement et contient encore un certain nombre de composés indésirables. Elle subit alors encore diverses étapes de raffinage plus ou moins importantes en fonction de l'utilisation ultérieure de l'huile. Le raffinage vise à éliminer les gommes, certains composés colorés, les acides gras libres responsables de l'acidité et des molécules volatiles responsables de mauvaises odeurs. (Parmentier et al., 2004)

Actuellement, et depuis des années, l'hexane est le solvant le plus utilisé à l'échelle industrielle pour extraire les huiles végétales. (Abert Vian et al., 2013) Selon (Fine et al., 2013), il est même le seul. Celui-ci est intéressant de par son apolarité et sa chaleur latente de vaporisation assez faible (31,56 kJ/mol à 25 °C ("HSDB A Toxnet Database (Toxicology Data Network)," August-10-2017)). Cette dernière caractéristique permet de l'évaporer facilement à faibles coûts énergétiques.

Inconvénients des méthodes conventionnelles

Les solvants constituent la source la plus importante de déchets des procédés chimiques (Pace et al., 2012) et l'utilisation de solvants organiques par les méthodes classiques d'extraction de lipides présente divers inconvénients. Premièrement, l'utilisation de solvants organiques dans la chaîne de production de denrées alimentaires préoccupe de plus en plus les consommateurs en ce qui concerne la santé publique, l'environnement et la sécurité. Ensuite, les solvants coûtent cher et les réglementations environnementales sont de plus en plus strictes et contraignantes. (Sahena et al., 2009) En effet, l'hexane est un produit dangereux car facilement inflammable. Il est également néfaste pour l'environnement, irritant et nocif, présentant une certaine toxicité sur le système nerveux central et pouvant provoquer des troubles de la fertilité. (Fine et al., 2013) Enfin, d'autres problèmes se posent encore, tels que la contamination éventuelle du produit final par des résidus de solvants organiques, la dégradation thermique de composés d'intérêts sensibles par des opérations de traitement à chaud, d'éventuelles réactions d'hydrolyses, etc. (Zekovic et al., 2016)

Extraction aux solvants de substitution

Pour toutes les raisons citées ci-dessus, la recherche d'alternatives se développe fortement. La recherche de solvants de substitution est une des pistes explorées. Les solvants d'origine végétale issus de la bioraffinerie représentent une alternative aux ressources fossiles et présentent un bilan environnemental positif. (Fine et al., 2013)

(Fine et al., 2013) distingue trois types d'agro-solvants en fonction de la filière dont ils sont issus. Premièrement, de l'éthanol, du sorbitol, des esters d'acide lactique et des dérivés d'acides succiniques peuvent être obtenus par fermentation de matières céréalières et sucrières. Deuxièmement, la transestérification dans un alcool de matières premières oléo-protéagineuses permet la formation d'esters d'acides gras et de dérivés de glycérol. Enfin, des hydrocarbures terpéniques peuvent être isolés par distillation de résines de conifères ou d'écorces de fruits.

Extraction au CO₂ supercritique

Alternative aux méthodes conventionnelles

L'extraction au fluide supercritique est une méthode d'extraction verte. (Zekovic et al., 2016) Elle permet d'obtenir des extraits exempts de résidus de solvant, et cela sans étape de séparation. (Dejoye Tanzi, 2013) L'extraction au dioxyde de carbone supercritique représente une alternative prometteuse aux solvants conventionnels ou même aux extractions mécaniques par pressage pour les extractions de lipides, aussi bien dans l'industrie agro-alimentaire que pharmaceutique. Elle permet même une meilleure rétention des composés aromatiques. (Sahena et al., 2009)

Fluides supercritiques

En fonction des conditions de température et pression dans lesquelles il se trouve, un corps pur peut se présenter sous différents états : solide, liquide et gazeux. (Figure 13) Au delà d'un certain point appelé critique, caractérisé par une température et une pression critique, le comportement du fluide dit supercritique adopte un comportement intermédiaire entre celui de l'état liquide et de l'état gazeux. (Herzi, 2013) Sa densité, et donc sa masse volumique, est élevée et semblable à celle des liquides alors que sa viscosité est faible et du même ordre de grandeur que celle des gaz. Sa diffusivité est intermédiaire entre celle des gaz et des liquides. (Dejoye Tanzi, 2013; Herzi, 2013) Le tableau 7 expose les propriétés physiques du CO₂ dans ses différents états.

Tableau 7 : Propriétés physiques du CO₂ à l'état de gaz, supercritique et liquide, d'après (Herzi, 2013)

Etat	Propriétés Masse volumique ρ (kg/m ³)	Diffusivité D (m ² /s)	Viscosité η (Pa.s)
Gaz	0,6 – 2	$(1 - 4) \cdot 10^{-5}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-5}$
Supercritique	200 – 500	$0,7 \cdot 10^{-7}$	$(1 - 4) \cdot 10^{-5}$
Liquide	600 – 1600	$(0,2 - 2) \cdot 10^{-9}$	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-3}$

Une faible viscosité permet une meilleure pénétration du fluide dans les solides (Sahena et al., 2009; Herzi, 2013), favorisant les transferts de masse. (Herzi, 2013) Une faible viscosité permet également un écoulement avec moins de frictions (Sahena et al., 2009), réduisant l'apport énergétique nécessaire pour déplacer le fluide. (Herzi, 2013) Une densité élevée favorise les interactions intermoléculaires (Herzi, 2013) et permet une meilleure solubilisation des composés dans le fluide. (Sahena et al., 2009) A l'état supercritique, le fluide possède de cette manière un certain pouvoir solvant vis-à-vis de solutés normalement à l'état liquide ou solide dans ces conditions de pression et température. (Herzi, 2013)

CO₂ supercritique comme solvant d'extraction

Avantages et propriétés du CO₂

Le fluide supercritique le plus utilisé pour les extractions de lipides est le dioxyde de carbone. (Sahena et al., 2009; Zekovic et al., 2016) Il présente en effet de nombreux avantages. Premièrement, ses conditions supercritiques sont facilement accessibles : $T_c = 31,1\text{ °C}$ et $p_c = 73,8\text{ bar}$. (Figure 13) De telles conditions d'opération sont faciles à atteindre et la température relativement basse est idéale pour extraire des molécules thermosensibles sans les dégrader. (Sahena et al., 2009) Ensuite, le CO₂ est peu coûteux (Sahena et al., 2009; Dejoye Tanzi, 2013; Zekovic et al., 2016) et facilement disponible à une pureté élevée (Sahena et al., 2009). Il est non toxique (Dejoye Tanzi, 2013; Herzi, 2013; Zekovic et al., 2016), non inflammable car il ne peut être oxydé (Herzi, 2013) et peu dangereux à manipuler (Sahena et al., 2009). Il est également chimiquement inerte (Dejoye Tanzi, 2013; Herzi, 2013; Zekovic et al., 2016), des réactions secondaires avec le CO₂ sont donc relativement rares. Enfin, il est évacué à pression atmosphérique et laisse donc un extrait exempt de solvant résiduel. (Herzi, 2013)

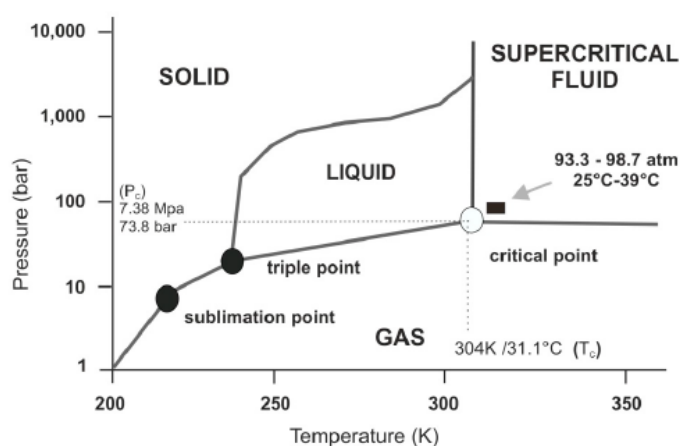


Figure 13 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone (Budisa et al., 2014)

Le CO₂ supercritique solubilise des composés apolaires et très peu polaires de faibles masses moléculaires. (Herzi, 2013) La puissance de solvant est d'autant plus élevée que le poids moléculaire du composé est faible. Les protéines, polysaccharides, sucres et sels minéraux n'y sont pas solubles. (Sahena et al., 2009)

Influence de divers paramètres

Le CO₂ supercritique possède un pouvoir solvant à géométrie variable. Cela signifie qu'il est possible de modifier ses propriétés en jouant sur les paramètres opératoires tels que la température et la pression. En modifiant ces deux paramètres, il est possible d'obtenir une certaine sélectivité du procédé en utilisant une certaine combinaison de pression et température qui affecte le rendement mais aussi la composition chimique de l'extrait obtenu. (Zekovic et al., 2016) En théorie, chaque composé est extractible de façon optimale à des conditions de température et pression précises. (Sahena et al., 2009)

La pression est le facteur présentant l'influence la plus importante sur le rendement massique d'extraction. En effet, une augmentation de pression entraîne une augmentation de la densité du CO₂, et donc une meilleure solubilité des composés de l'échantillon dans le fluide. (Zekovic et al., 2016) Cependant, l'augmentation de la masse volumique engendre à son tour une augmentation de la viscosité et limite le transfert de matière et donc la diffusivité. (Herzi, 2013)

La température a une influence sur deux paramètres. Une augmentation de température engendre une diminution de la densité du fluide et une augmentation de la pression de vapeur. Alors qu'une diminution de la densité provoque une diminution de la solubilité des composés, une augmentation de pression de vapeur a pour conséquence de l'augmenter. (Zekovic et al., 2016) La diffusivité augmente avec la température et la viscosité diminue. (Herzi, 2013)

D'autres facteurs ont également une influence sur le procédé d'extraction comme le débit de CO₂, la présence d'un co-solvant et la taille des particules de la matrice qui subi l'extraction. (Zekovic et al., 2016) Une augmentation du débit de CO₂ mène à un rendement massique d'extraction plus élevé. Cela s'explique par le fait qu'elle résulte en une diminution de l'épaisseur de la couche film autour des particules et donc une résistance au transfert de masse affaiblie. (Zekovic et al., 2016) Ensuite, le CO₂ étant une molécule non polaire, les lipides polaires ne sont pas extraits à cause de leur faible solubilité dans le CO₂ supercritique. Dans le but de remédier à cet inconvénient et d'améliorer le pouvoir solvant et donc l'efficacité d'extraction, la polarité du CO₂ supercritique peut être modifiée par ajout d'un co-solvant polaire. (Sahena et al., 2009) Généralement, les co-solvants les plus utilisés sont le méthanol, l'éthanol, l'eau ou encore des huiles végétales. Ils sont souvent ajoutés en faibles proportions (5 à 15 %). (Herzi, 2013)

5. Activité antioxydante

Oxydation, radicaux libres et antioxydants

L'oxygène, bien qu'indispensable pour la vie, présente des aspects indésirables. Il engendre la formation et l'activation de composés chimiques, appelés espèces réactives oxygénées (ROS), qui ont tendance à réagir avec d'autres molécules en les oxydant formant de cette façon des radicaux libres. Un radical libre est une espèce moléculaire qui contient un électron non apparié dans son orbital atomique. Cet électron provoque une instabilité et une forte réactivité du composé. Les radicaux libres peuvent donner un électron à d'autres molécules ou leur en arracher un, se comportant comme oxydant ou réducteur. (Lobo et al., 2010)

Un antioxydant est une molécule suffisamment stable que pour donner un électron à un radical libre et de cette manière le neutraliser, réduire sa capacité à nuire. Les antioxydants peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Ils peuvent agir soit en rompant une réaction en chaîne, en donnant des électrons aux radicaux libres, soit en éliminant des espèces réactives oxygénées en étanchant les catalyseurs à la source de la chaîne. (Lobo et al., 2010)

Activité antioxydante et santé

L'organisme produit en permanence des petites quantités de radicaux libres. Ceux-ci sont impliqués dans diverses fonctions biologiques comme la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la transduction de signaux cellulaires et d'autres encore, et sont des produits de réactions énergétiques. L'organisme est pourvu de systèmes de défense qui maîtrisent cette production. Ces mécanismes de défense sont aussi bien enzymatiques que non-enzymatiques et permettent de maintenir la balance antioxydant/prooxydant à l'équilibre. (Favier, 2003)

Lorsque les espèces radicalaires sont présentes en excès, l'organisme ne parvient plus à les neutraliser et est soumis à un stress oxydant. Cet excédant de radicaux libres peut avoir plusieurs origines : une production trop importante des suite d'irradiations ou un déficit en antioxydants par exemple. Ce déséquilibre provoque des dégâts aux molécules biologiques. Les radicaux s'attaquent aux lipides, constituants principaux des membranes biologiques, induisant

des réactions en chaîne, aux molécules d'ADN qui sont la mémoire de toute la composition biochimique des cellules, et aux protéines qui perdent alors leur intégrité et leur fonctionnalité. (Favier, 2003) Un déséquilibre entre oxydant et antioxydant est donc corrélé à divers dégâts au niveau de la cellule et des fonctions cellulaires défectueuses. (Kurian, 2012) Le stress oxydant est la cause initiale de différentes maladies telles que le cancer, la sclérose latérale amyotrophique, etc et est un facteur pouvant provoquer l'apparition de maladies plurifactorielles telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'Alzheimer, etc. (Favier, 2003) De nombreuses pathologies métaboliques et troubles dégénératifs liés à l'âge sont étroitement liés aux procédés oxydatifs dans l'organisme. (Peter et al., 2012) En effet, avec l'âge, les défenses antioxydantes s'altèrent et la production mitochondriale de radicaux augmente. (Favier, 2003)

Les antioxydants sont donc cruciaux pour maintenir l'intégrité et la fonctionnalité des membranes cellulaires, protéines et acides nucléiques car ils peuvent piéger les radicaux libres et éviter les dégâts provoqués par un stress oxydatif. (Kurian, 2012)

Activité antioxydante et produits agro-alimentaires

Les procédés oxydatifs sont également problématiques au niveau de la qualité des aliments, autant durant leur conservation que lors de leur fabrication et transformation. (Singh et al., 2008) Dans les denrées alimentaires, les composés sensibles à l'oxydation sont les acides aminés, peptides et protéines, les sucres et les lipides polaires. (Pokorný et al., 2012)

Pour prévenir les dégâts oxydatifs, différents antioxydants sont utilisés. Les antioxydants synthétiques les plus répandus sont le BHA et le BHT (butylhydroxyanisole et butylhydroxytoluène) (Singh et al., 2008). L'acide ascorbique, les caroténoïdes et lycopes sont également employés. Généralement, un mélange de différents antioxydants est utilisé. (Pokorný et al., 2012) Cependant, suite au nombre et à la gravité croissants de cas de problèmes de santé publique, la confiance des consommateurs en ce qui concerne la sécurité alimentaire s'altère. (Tassou et al., 2012) En effet, des études toxicologiques ont associé à certains antioxydants synthétiques des effets cancérigènes, hépatotoxiques (Singh et al., 2008), tératogènes ou de présenter une toxicité résiduelle. De même que de nombreux pathogènes alimentaires développent une résistance croissante aux agents utilisés. Tous ces problèmes résultent en une pression sur les fabricants pour éliminer ces additifs chimiques et rechercher des alternatives d'origine naturelle. (Tassou et al., 2012)

Activité antioxydante des plantes

Les plantes renferment de nombreux composés antioxydants tels que des caroténoïdes, rétinoïdes, tocophérols, de l'acide ascorbique, des acides phénoliques, flavonoïdes et polyphénols. Les huiles essentielles présentent également une activité antioxydante grâce aux composés phénoliques et terpénoïdes qu'elles contiennent. (Bakkali et al., 2008) En ce qui concerne les extraits lipidiques, la question est plus compliquée. Certains travaux démontrent l'absence de pouvoir antioxydant d'extraits lipidiques alors que d'autres leur reconnaissent un effet antiradicalaire. (Li et al., 2007) et (Yi et al., 2009) ont conclu que l'extrait lipidique et leurs acides gras polyinsaturés de noyer du Japon et de marc de raisin ne présentent aucun pouvoir antioxydant, alors que (Liu et al., 2009) ont associé aux acides gras insaturés de l'huile de graine d'*Opuntia dillenii* son activité antioxydante. (Ramadan et al., 2003) ont démontré l'efficacité de fractions lipidiques de nigelle, coriandre et niger à réduire le radical DPPH et ont associés cette capacité aux phospholipides en particulier. (Miraliakbari et al., 2008) ont attribué l'activité antioxydante des huiles de noisettes autant aux composés phénoliques qu'aux phospholipides.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Culture, récolte et préparation du matériel végétal

Les graines matures de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), d'anis vert (*Pimpinella anisum* L.) et de carvi (*Carum carvi* L.) utilisées lors de ce travail proviennent de plants cultivés en Tunisie en juin 2016, dans la région de Menzel Témime au Nord-Est du pays (latitude : 36°46' Nord, longitude : 10°59' Est, altitude : 38 m). Cette région appartient à l'étage bioclimatique semi aride supérieur. Le travail de prospection et de collecte des graines a été réalisé à l'aide de la Cellule Territoriale de Vulgarisation de Menzel Témime. Une fois récoltées, les graines ont été conservées à l'obscurité dans des récipients hermétiques.

Afin d'optimiser l'extraction et obtenir une meilleure représentativité, ces graines ont été broyées le plus finement possible à l'aide d'un broyeur IKA A11 basic.

Teneur en matière sèche

Bien que les graines soient une matrice relativement sèche, la teneur en matière sèche de celles-ci a tout de même été calculée. Une prise d'essai de 2 g de poudre de graines a été placée à l'étuve à 70 °C durant 16 heures. La teneur en matière sèche est calculée de la manière suivante :

Équation 1 : Teneur en matière sèche

$$\text{Teneur en matière sèche} = \frac{m_{\text{prise essai séchée}}}{m_{\text{prise essai}}} \times 100 \quad (\text{g}/100 \text{ g de poudre})$$

Chaque mesure a été répétée trois fois.



2. Extractions des huiles

Les fractions lipidiques de graines de fenouil, d'anis vert et de carvi ont été extraites selon quatre méthodes différentes. Premièrement, des méthodes conventionnelles ont été utilisées. Ensuite, des méthodes alternatives visant à réduire l'impact écologique de l'opération d'extraction ont été effectuées : une extraction au CO₂ supercritique et une extraction selon la méthode de Soxhlet à l'aide de 2-méthyl tétrahydrofurane, un agro-solvant.

Extraction par l'hexane selon la méthode de Soxhlet

L'hexane est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des lipides. (Abert Vian et al., 2013; Fine et al., 2013) Le tableau 8 reprend ses principales caractéristiques chimiques et physiques intéressantes dans le cadre de ce travail.

Tableau 8 : Propriétés chimiques et physiques du n-hexane

Formule et structure moléculaires	C ₆ H ₁₄		1
Masse molaire (g/mol)	86,18		2
Densité à 25 °C (g/mL)	0,659		3
Température d'ébullition (°C)	68,73		2
Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/L)	9,5		2
Log P ⁴	3,90		1
Flash point (°C)	- 22		1
Sécurité ⁵			1

Sources : ¹(“PubChem Substance and Compound databases,” August-10-2017), ²(“HSDB A Toxnet Database (Toxicology Data Network),” August-10-2017), ³(“Product Specification Sigma-Aldrich,” August-10-2017)

Pour cette première méthode d'extraction, l'huile végétale est extraite en continu de la poudre de graines à l'aide d'un extracteur de Soxhlet. Pour cela, 50 g de poudre de graines ont été pesés dans une cartouche de cellulose (Schleicher & Schuele) qui a ensuite été placée dans l'extracteur. Celui-ci est raccordé à un réfrigérant d'une part et à un ballon d'autre part. Un volume de 400 mL de n-hexane (HPLC-S, Biosolve) a été utilisé pour extraire l'huile. Une partie de ce volume a été versé dans l'extracteur de façon à ce que le matériel végétal macère une nuit avant le lancement de l'extraction. Le reste a été versé dans le ballon avec quelques pierres d'ébullition (pierre ponce, VWR). Le ballon est ensuite porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs de solvant se condensent dans le réfrigérant pour couler dans l'extracteur où il extrait les lipides de l'échantillon. Le solvant en contact avec l'échantillon est continuellement renouvelé. Le dispositif est chauffé durant huit heures après observation du premier reflux de solvant.

⁴ Le Log P est un paramètre caractéristique d'une molécule donnant une indication sur son caractère lipophile. Il correspond au logarithme du coefficient de partage de la molécule entre l'octanol et l'eau, qui est le rapport des concentrations de ce composé entre ces deux phases à l'équilibre. Ce paramètre est très utilisé dans l'étude des médicaments, mais il est également intéressant dans le cadre de ce travail, étant donné que les solvants sont utilisés dans le but d'extraire les lipides. Plus la valeur de log P est positive et élevée, plus la molécule est lipophile. (“Lipophilicity,” 2017)

⁵ Les pictogrammes CLP et leurs significations sont repris en annexe. (Annexe 1)

L'hexane a ensuite été évaporé de l'extrait récupéré afin d'obtenir l'huile extraite uniquement. Cela a été fait à l'aide d'un évaporateur rotatif (bain marie Heidolph LABOROTA, pompe Labobase/Laborota 4000 Heidolph G4 type haut) à une température de 60 °C et une pression partant de 500 mbar pour diminuer progressivement jusqu'à 100 mbar afin d'éliminer les dernières traces de solvant.

Le rendement massique est le rapport entre la masse d'huile végétale extraite et la masse de matière végétale ayant subi l'extraction. Il exprimé en pourcentage (g/100 g) sur matière fraîche selon la formule suivante :

Équation 2 : Rendement massique d'extraction

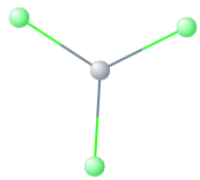

$$\text{rendement massique d'extraction} = \frac{\text{masse huile extraite}}{\text{masse prise d'essai}} \times 100 \quad (\text{g}/100 \text{ g d'huile})$$

Chaque opération d'extraction a été répétée trois fois pour chaque graine et la moyenne de ces trois répétitions a été calculée.

Extraction selon la méthode de Folch

Dans le cas de la méthode de Folch, le solvant solubilisant et extrayant les lipides est le chloroforme. (Tableau 9)

Tableau 9 : Propriétés chimiques et physiques du chloroforme

Formule et structure moléculaires	CHCl ₃		1
Masse molaire (g/mol)	119,38		2
Densité à 25 °C (g/mL)	1,48		3
Température d'ébullition (°C)	61,17		2
Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/L)	7,95.10 ³		2
Log P	1,97		1
Flash point (°C)	/		1
Sécurité			1

Sources : ¹(“PubChem Substance and Compound databases,” August-10-2017), ²(“HSDB A Toxnet Database [Toxicology Data Network],” August-10-2017), ³(“Product Specification Sigma-Aldrich,” August-10-2017)

Une prise d'essai de 20 g de poudre de graines a été placée dans un erlenmeyer auquel un volume de 200 mL d'une solution de chloroforme/méthanol 2/1 v/v a été ajouté (solvants de grade analytique, Scharlau). La matière végétale a macéré dans le mélange de solvants durant 15h30 sous agitation orbitale d'environ 100 min⁻¹. Le mélange filtré a été récupéré dans des ampoules à décanter et le précipité a été lavé avec environ 50 mL du mélange chloroforme/méthanol. Ensuite, 80 mL d'une solution de NaCl 0,58 % ont été ajoutés (NaCl technique VWR). L'ensemble a été agité puis laissé décanter durant 18h30. La phase

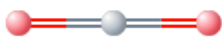

chloroformique a été séchée sur poudre de Na₂SO₄ anhydre (Carlo Erba) sur filtre plissé et récupérée dans des ballons tarés. Le chloroforme a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (bain marie Heidolph LABOROTA, pompe Labobase/Laborota 4000 Heidolph G4 type haut) à une température de 35 °C et une pression allant de 350 mbar à 89 mbar afin d'éliminer les dernières traces de solvant et de ne garder que l'huile extraite.

Chaque graine a subi trois opérations d'extraction et la moyenne des trois rendements massiques a été calculée. Le rendement massique est calculé de la même façon que pour l'extraction selon la méthode de Soxhlet (Equation 2).

Extraction au CO₂ supercritique

Pour l'extraction au CO₂ supercritique, le solvant utilisé est le dioxyde de carbone sous son état supercritique. Il présente donc des propriétés intermédiaires à celles qu'il présente à l'état gazeux et liquide et qui le rendent très intéressant comme solvant d'extraction (*cfr. Introduction, p. 25-27*). Le tableau suivant (Tableau 10) reprend les caractéristiques chimiques et physiques intéressantes du dioxyde de carbone.

Tableau 10 : Propriétés chimiques et physiques du dioxyde de carbone

Formule et structure moléculaires	CO ₂ 	1
Masse molaire (g/mol)	44,010	2
Densité (g/mL)	gaz (0 °C, 1 atm) : 1,976.10 ³ (g/mL) liquide (0 °C, 34,3 atm) : 0,914 (-) critique : 0,464 (-)	2
Température d'ébullition (°C)	- 78,464	2
Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/L)	2,9.10 ³	2
Log P	0,83	1
Flash point (°C)	/	1
Sécurité		1

Sources : ¹(“PubChem Substance and Compound databases,” August-10-2017), ²(“HSDB A Toxnet Database (Toxicology Data Network),” August-10-2017), ³(“Product Specification Sigma-Aldrich,” August-10-2017)

L'appareil utilisé pour les extractions au CO₂ supercritique a été conçu par la firme Séparex. (Figures 14 et 15) Il se compose de différentes parties.⁶

Le CO₂ est présent sous forme liquide dans la bonbonne (1). Il est pompé à l'aide d'une première pompe (2) et passe par un refroidisseur (3) avant d'entrer dans le circuit. C'est au niveau de la pompe que le débit de CO₂ est régulé. Le CO₂ est alors éventuellement rejoint par le co-solvant pompé par une seconde pompe (4) à hauteur d'une intersection (5) avant d'arriver à la cellule d'extraction de 15 mL (6) où se trouve l'échantillon. La cellule d'extraction est plongée dans un bain marie (7). C'est à cette hauteur du circuit que le paramètre température est réglé. La pression dans le circuit est réglée à l'aide d'un régulateur de pression (8) situé après la cellule d'extraction. Enfin, le CO₂ contenant les molécules extraites après passage dans la cellule subit une chute de pression dans le séparateur (9). Il redevient alors gazeux et se sépare des molécules extraites. L'extrait est récupéré après ce séparateur (10).

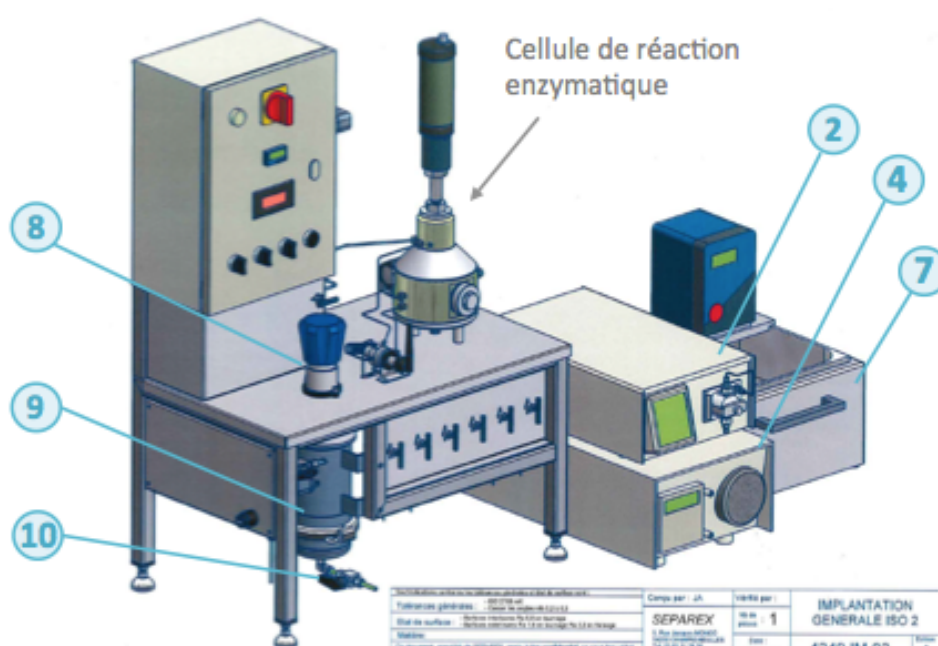


Figure 14 : Représentation de l'appareil utilisé pour les extractions au CO₂ supercritique

⁶ L'appareil contient également une cellule de réaction enzymatique mais celle-ci n'est pas utilisée dans ce travail.

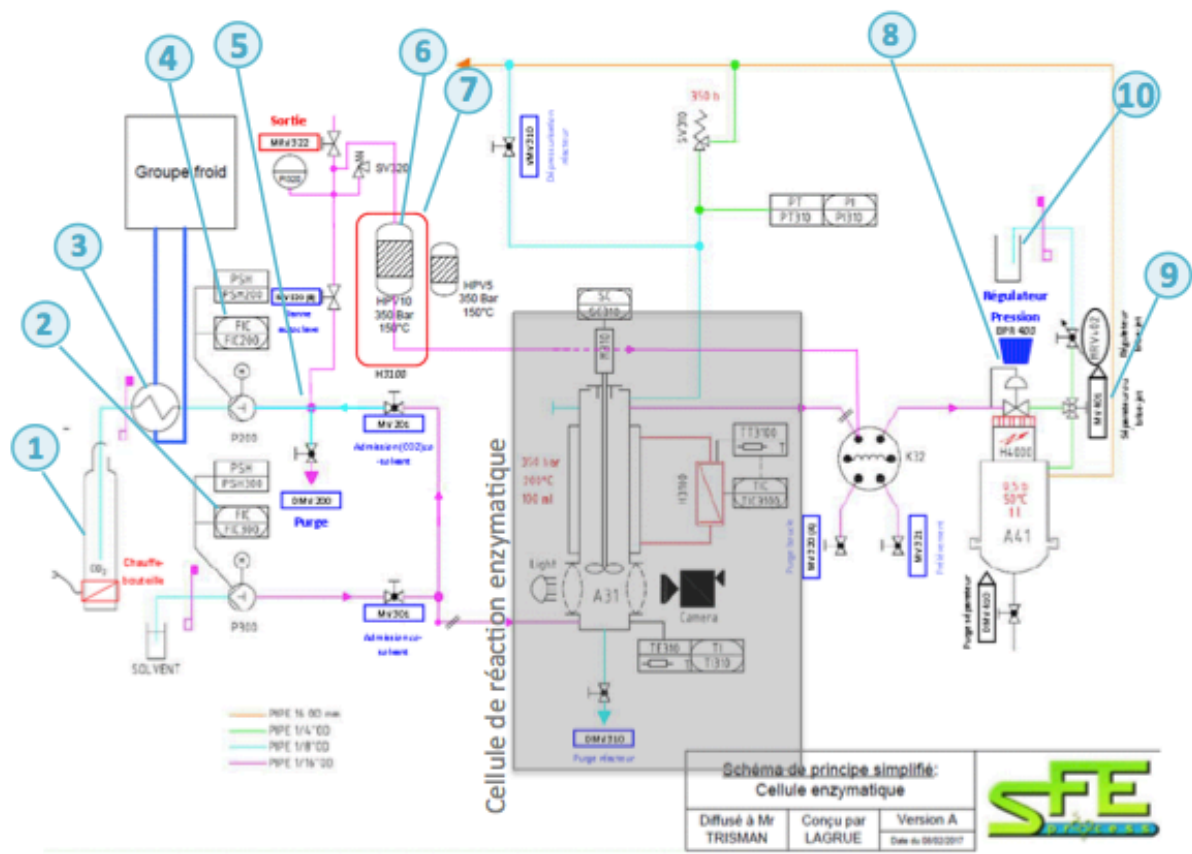


Figure 15 : Schéma de principe simplifié de l'appareil utilisé pour les extractions au CO2 supercritique

Comme expliqué dans la partie bibliographique de ce travail, la méthode d'extraction au CO₂ supercritique permet d'extraire des composés apolaires et légèrement polaires à basse température. Différents paramètres permettent de réguler les conditions d'extractions : la température, la pression, le débit de CO₂, et la durée d'extraction. Après avoir testé quelques combinaisons de paramètres et sur base des travaux menés par (Zekovic et al., 2016), les conditions retenues pour extraire la fraction lipidique des graines de fenouil, d'anis vert et de carvi sont une température de 40 °C, une pression de 200 bars, un débit de CO₂ de 14 mL/min et un débit d'éthanol (absolu, Merck) utilisé comme co-solvant de 0,7 mL/min. L'opération d'extraction a été maintenue durant trois heures. Le CO₂ utilisé est issu de bonbonnes fournies par la firme Air Liquide (référence I5100). Ces bonbonnes renferment du dioxyde de carbone à l'état liquide (1013).

Il n'a pas été possible d'extraire une quantité satisfaisante de matière par flux de CO₂ uniquement. Il a donc été nécessaire de faire circuler un co-solvant dans le circuit. Le choix s'est arrêté sur l'éthanol, qui est très souvent utilisé comme co-solvant et qui peut être considéré comme vert. Celui-ci a donc dû être évaporé afin de ne garder que l'huile extraite de la matrice végétale. Cela a été fait à l'aide d'un évaporateur rotatif (bain marie Heidolph LABOROTA, pompe Labobase/Laborota 4000 Heidolph G4 type haut) à une température de 40 °C et une pression allant de 250 mbar jusqu'à 75 mbar afin d'éliminer les dernières traces de solvant.

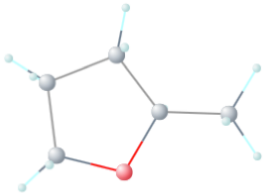

Le rendement massique est toujours calculé selon la même formule (Equation 2) et chaque extraction a été répétée trois fois pour chaque graine permettant de calculer la moyenne de ces trois répétitions.

Extraction par un solvant alternatif selon la méthode de Soxhlet

Afin de pouvoir comparer une méthode d'éco-extraction, la méthode de Soxhlet a été reprise en utilisant un agro-solvant : le 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF).

En effet, le MeTHF présente divers avantages et est généralement considéré comme étant une option de substitution aux solvants traditionnels viable. Il est d'ailleurs de plus en plus utilisé dans des installations industrielles pilotes. Premièrement, il peut être issu de ressources renouvelables, à partir de furfural ou d'acide lévulinique. Ensuite, son impact sur l'environnement est moindre. Dans le cas d'une fuite de MeTHF, ce dernier est dégradé de façon abiotique par l'air et les rayons du soleil. De plus, il est remarquablement stable en comparaison aux autres solvants cycliques. Enfin, en ce qui concerne l'impact du solvant sur la santé, il est également limité car des études toxicologiques préliminaires autorisent son utilisation dans des procédés pharmaceutiques. (Pace et al., 2012) Lors de travaux sur des solvants alternatifs pour extraire les lipides de levures oléagineuses, (Breil et al., 2016) ont conclu que le MeTHF est un bon candidat pour remplacer l'hexane. Le tableau 11 présente ses principales caractéristiques chimiques et physiques.

Tableau 11 : Propriétés chimiques et physiques du 2-méthyltétrahydrofurane

Formule et structure moléculaire	C ₅ H ₁₀ O 	1
Masse molaire (g/mol)	86,134	1
Densité à 25 °C (g/mL)	0,86	2
Température d'ébullition (°C)	78 – 80	2
Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/L)	<i>Information non trouvée</i>	
Log P	<i>Information non trouvée</i> ⁷	
Flash point (°C)	- 10	2
Sécurité		1

Sources : ¹(“PubChem Substance and Compound databases,” August-10-2017), ² (“Product Specification Sigma-Aldrich,” August-10-2017)

Pour ces extractions, des conditions similaires à celles décrites pour l'extraction selon Soxhlet à l'hexane ont été appliquées. Environ 10 g de poudre de graines ont été placés dans une cartouche de cellulose. Un volume de 75 mL de 2-méthyl tétrahydrofurane (Sigma-Aldrich) a servi à l'extraction dont 20 à 25 mL sont versés dans l'extracteur contenant la cartouche afin que la matière végétale macère durant une nuit entière. Le lendemain, le dispositif a tourné durant 8 heures après avoir observé le premier reflux de solvant.

⁷ Aucune valeur de logP n'a été trouvée pour le 2-méthyltétrahydrofurane. Cependant, (Marcus, 1993) place le MeTHF entre l'hexane et le chloroforme en termes de polarité.

Comme pour les autres extractions, le solvant a été évaporé à l'aire d'un évaporateur rotatif (bain marie Heidolph LABOROTA, pompe Labobase/Laborota 4000 Heidolph G4 type haut) à une température de 40 °C et une pression allant de 250 mbar jusqu'à 50 mbar afin d'éliminer les dernières traces de solvant

Pour cette méthode également, trois répétitions d'extraction ont été effectuées pour chaque graine. Le rendement massique est calculé selon l'équation 2.

3. Caractérisation des huiles

Profil en acides gras

Le profil en acides gras a été déterminé par une méthode de chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, les acides gras doivent être dérivatisés en esters méthyliques afin d'être plus volatils.

Une goutte d'huile a été déposée des tubes étanches dans lesquels ont ensuite été ajoutés 0,2 mL d'hexane (Biosolve) et 0,5 mL de solution de BF₃ (préparation de la solution : 55 mL méthanol sec (méthanol de grade analytique, Scharlau), 20 mL hexane (Biosolve), 25 mL BF₃ (trifluorure de bore 14 % dans méthanol, Sigma-Aldrich)). Le tout a incubé à 75 °C durant 90 minutes. Une fois le milieu réactionnel refroidi, 0,5 mL d'une solution de NaCl (NaCl technique, VWR) saturé et 0,2 mL d'H₂SO₄ 10 % ont été ajoutés. Le tout a été homogénéisé par vortex. Enfin, 8 mL d'hexane (Biosolve) ont été ajoutés afin de diluer l'échantillon.

Cette solution a été injectée en GC-FID (Gas Chromatography – Flame Ionization Detector). L'appareil utilisé au laboratoire est un HP 6890 Series avec une colonne capillaire polaire VF Wax ms 0,25 µm x 250 mm x 30 m. Un volume de 0,5 µL a été injecté en mode ON-COLUMN. Le programme de températures est le suivant : injection à 55 °C, montée à 150 °C avec une vitesse de 30 °C/min, puis directement à 250 °C avec une vitesse de 5 °C/min pour rester à cette température durant 15 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,7 mL/min.

Les pics ont été identifiés à l'aide des temps de rétention obtenus pour un témoin comprenant de nombreux acides gras. En effet, chaque ester méthylique d'acide gras (EMAG) est caractérisé par un temps de rétention, qui est fonction autant de la longueur de la chaîne carbonée que du nombre d'insaturations que celle-ci comporte et de la (des) position(s) et configuration(s) de cette(ces) dernière(s). De plus, un échantillon de chaque combinaison graine/méthode d'extraction a été injecté en GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry) afin d'identifier les pics non identifiés. L'appareil utilisé est un Agilent 5973 Network, la colonne et le programme utilisés sont les mêmes que pour les analyses par GC-FID. L'identification des molécules a été faite à l'aide de la base de donnée pal600k.

Les analyses ont été répétées trois fois (sauf perte d'échantillon par fuite lors de la réaction d'estérification) sur chacun des trois extraits correspondant à une combinaison graine/méthode d'extraction.

Le profil en acide gras est exprimé de manière relative, c'est-à-dire que la composition en chacun des acides gras est exprimée en pourcentage par rapport à la teneur totale en acides gras (AGT). Pour cela, les aires des pics correspondants aux acides gras ont été sommées et la concentration relative en un acide gras est égale au rapport de son aire sur celui de la somme de toutes les aires, comme l'exprime l'équation 3 suivante :

Équation 3 : Concentration relative en un AG par rapport à la teneur totale en AG

$$\text{Concentration relative AG} = \frac{\text{Aire AG}}{\text{Aire totale des AG}} \quad (\% \text{ AGT})$$

Teneurs en acides gras

Etant donné que tous les résultats obtenus par les analyses précédemment présentées ne délivrent que des informations relatives sans aucune notion quantitative, des analyses ont été effectuées par la suite à l'aide d'un standard interne. Cela permet de pouvoir quantifier les acides gras présents dans les huiles de façon absolue, en terme massique. Le standard interne utilisé est un triglycéride d'acides gras à 17 atomes de carbone car cet acide gras n'est pas présent dans les échantillons analysés. Pour ces analyses, le mode opératoire a été légèrement modifié. Premièrement, la goutte d'huile a été exactement pesée. Ensuite, les 0,2 mL d'hexane ajoutés ont été remplacés par 0,4 mL d'une solution de référence 1 mg/mL de triglycéride de C17 (glycéryl triheptadécanoate $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) préparée dans l'hexane. Les étapes suivantes sont exactement identiques à celles expliquées ci-dessus. La dernière différence est le programme de température d'analyse chromatographique qui a été légèrement modifié de façon à raccourcir le temps d'analyse sans avoir d'impact sur les temps de rétention des EMAG : injection à 55 °C, montée à 150 °C avec une vitesse de 30 °C/min, puis directement à 235 °C avec une vitesse de 5 °C/min, enfin à 250 °C à 50 °C/min pour rester à cette température durant 5 minutes.

La concentration absolue d'un acide gras dans une huile est alors calculée de la façon suivante :

Équation 4 : Concentration absolue en AG dans l'huile

$$\text{Concentration AG} = \frac{m_{SI} \times \frac{A_{SI}}{A_{AG}}}{m_{\text{prise d'essai}}} \quad (\text{mg/g d'huile})$$

Teneur et profil en stérols

Le profil en stérols est déterminé par chromatographie en phase gazeuse et requiert différentes étapes préliminaires : saponification, extraction liquide-liquide afin de ne récupérer que la fraction insaponifiable, purification des stérols par chromatographie sur couche mince et enfin dérivatisation des stérols. La méthode fait usage de la bétuline (Figure 16), qui est un stérol artificiel, comme standard interne.

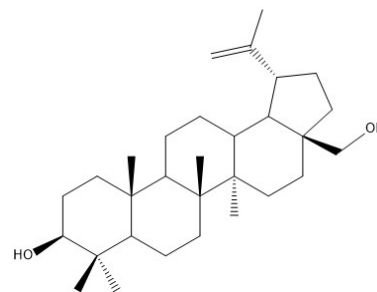


Figure 16 : Structure de la bétuline (d'après (Winkler-Moser, n.d.))

Une prise d'essai d'environ 0,2 grammes de matière grasse a été placée dans un ballon rodé de 100 mL.

Afin de saponifier la matière grasse, 10 mL d'une solution de KOH (KOH solide, Carlo Erba) 2 M préparée dans le méthanol ont été ajoutés, ainsi que quelques pierres poreuses (pierre ponce, VWR). Le mélange a alors été porté à ébullition sous réfrigérant durant une heure. Ensuite, une fois le mélange refroidi, le réfrigérant a été rincé à l'aide de 5 mL d'eau distillée. Le standard interne a été ajouté : 0,2 mL d'une solution de bétuline (standard analytique, Sigma-Aldrich) 1 mg/mL préparée dans du méthanol (analytique, Scharlau) (la bétuline est d'abord solubilisée dans un peu de chloroforme).

Ensuite, les fractions saponifiables et insaponifiables de l'huile ont été séparées par extraction liquide-liquide. Pour cela, le contenu du ballon a été transvasé dans une ampoule à décanter de 250 mL. Le ballon a ensuite été rincé à l'aide de 5 mL d'eau distillée, qui ont également été versés dans l'ampoule. L'extraction s'est faite à l'aide de 25 mL d'éther diéthylique (Scharlau) à trois reprises, avec agitation (3 x 3 x 10 mouvements d'aller et venue) et décantation. L'agitation a été menée avec précaution afin d'éviter la formation d'émulsion. Pour la première extraction, les 25 mL ont été utilisés pour rincer le ballon avant d'être versés dans l'ampoule. La phase méthanol-eau (saponifiable, inférieure) a été récupérée dans un premier erlenmeyer et la phase étherée (insaponifiable, supérieure) dans un second erlenmeyer. La phase méthanol-eau (1^e erlenmeyer) a de nouveau été extraite à l'aide de 25 mL de éther diéthylique. La nouvelle phase méthanol-eau a été séparée de la phase étherée. Cette dernière a été rassemblée à la phase étherée de la première extraction (2^e erlenmeyer). La troisième extraction s'est déroulée de la même façon. Les trois phases étherées ont été nettoyées à l'aide de 10 mL d'eau distillée à trois reprises. Les phases aqueuses ont été éliminées et la phase étherée résultante a été récupérée et séchée à l'aide de Na₂SO₄ anhydre (Carlo Erba) qui a ensuite été éliminée par filtration sur filtre plissé. L'éther diéthylique a été évaporé.

Afin de purifier les stérols, une chromatographie sur couche mince préparative a été effectuée. Pour cela, l'extrait a été repris dans 2 - 2,5 mL de chloroforme (Scharlau) lors de trois rinçages du ballon à l'aide d'environ 1 mL de CHCl₃, afin de transvaser dans un tube sovirel. Le chloroforme a alors été évaporé pour reprendre le dépôt insaponifiable dans 0,2 mL de chloroforme. Sur une plaque de silice (gel de silice G60, Merck) de 0,5 mm d'épaisseur ont été étalés 120 µL de cet extrait, ainsi qu'un spot de solution témoin (1 mg/mL de bétuline et de cholestérol (Sigma-Aldrich) dans le chloroforme) de part et d'autre de la ligne d'échantillon. La migration s'est faite à l'aide d'un éluant chloroforme/éther diéthylique/ammoniaque 90/10/0,5 v/v/v (ammoniaque env. 25 %, ucb). La révélation s'est effectuée à l'aide de 2,7-dichlorofluorescéine (Merck) 0,2 % dans éthanol (Scharlau) sous lumière ultraviolette ($\lambda = 254$ nm). Les lignes de migration correspondant aux stérols et à la bétuline ont été identifiées grâce au témoin de bétuline et cholestérol posé de part et d'autre de l'échantillon et ont été récupérées dans un tube sovirel. Afin d'extraire les stérols et la bétuline de la silice, 3 mL de chloroforme ont été ajoutés à la silice récupérée. Le tube a été vortexé à 2500 rpm durant 10 secondes, puis centrifugé à 2000 rpm durant 2 minutes. Le surnageant a été récupéré dans un autre tube sovirel pourvu d'un bouchon étanche avec un joint en téflon. Le culot (la silice) a été épuisé en répétant trois fois ces étapes (reprise dans 3 mL de chloroforme, vortex, centrifugation, récupération du surnageant). Le surnageant récupéré a alors été placé sous balayage d'azote avec chauffage léger afin d'évaporer le chloroforme.

Afin de rendre les stérols volatils, ceux-ci doivent être dérivatisés par triméthylsilylation. Pour cela, 100 µL de pyridine (Sigma-Aldrich) et 100 µL de BSTFA-TMCS 99-1 (Supelco Sigma-Aldrich) ont été ajoutés aux stérols. Les tubes bien fermés ont été placés à l'étuve à 90 °C durant 30 minutes. Après cela, l'excès de réactifs de silylation a été évaporé sous balayage d'azote. Le contenu sec a été solubilisé dans 1 mL d'hexane (Biosolve) afin d'être injecté en chromatographie en phase gazeuse.

La solution obtenue a enfin été injectée a en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur FID. Un appareil HP 6890 Series et une colonne capillaire apolaire HP-5MS 5% phényl méthyl siloxane 0,25 µm x 250 mm x 30 m ont été utilisés. Un microlitre d'échantillon a été injecté en mode SPLITLESS. En ce qui concerne le programme de températures, le four a été maintenu à 50 °C durant une minute, puis est monté jusque 275 °C à une vitesse de 30 °C/min, pour rester à cette température durant 30 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1,5 mL/min.

L'identification des stérols s'est faite sur plusieurs bases. Tout d'abord, à l'aide des temps de rétentions caractéristiques de chacun des stérols triméthylsilylés. Les temps de rétention sont retrouvés dans la littérature. (Winkler-Moser, n.d.; Lognay et al., 1993) Ils peuvent être calculés de manière relative par rapport à un pic de référence comme le β-sitostérol pour plus de précision. De plus, un échantillon de chaque condition (graine/méthode d'extraction) a été injecté en GC-MS, sur un appareil Agilent 5973 Network muni d'une colonne HP-5MS 5% phényl méthyl siloxane 0,25 µm x 250 mm x 30 m et selon un programme similaire à celui utilisé en GC-FID. La base de donnée pal600k a servi à l'identification des molécules, mais les spectres de masses ont également été analysés en cas de doute à l'aide de (Lognay et al., 1990).

Les concentrations en les différents stérols identifiés ont été déterminées à l'aide de calculs de proportionnalités avec la bétuline, selon l'équation 5. Le facteur de réponse de la bétuline par rapport au stérols peut être considéré comme étant égal à 1. (Lognay et al., 1990) C'est pour cette raison qu'il ne figure pas de correction dans la formule.

Équation 5 : Concentration en stérol de l'huile

$$\text{Concentration stérol} = \frac{m_{SI} \times \frac{A_{SI}}{A_{stérol}}}{m_{prise\ d'essai}} \quad (\text{mg/g d'huile})$$

Cette analyse a été répétée une fois sur chacune des trois répétitions d'extraction uniquement, étant donné le temps et la quantité de matière grasse qu'elle nécessite.

Profil en composés phénoliques

Préparation d'extraits méthanoliques

Afin de pouvoir étudier la composition phénolique des huiles, des extraits méthanoliques ont été préparés à partir de celles-ci. Pour cela, 0,2 grammes d'huile ont été pesés. A ceux-ci on été ajoutés 2 mL de méthanol (grade analytique, Scharlau). Le tout a été agité à 1000 rpm durant 15 min avec un vortex MultiReax Heidolph, puis centrifugé à 2500 rpm durant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse Thermoelectron Corporation. Le surnageant a été récupéré. Le culot a été épuisé en répétant une deuxième et une troisième fois l'ajout de méthanol, l'agitation et la centrifugation. Les surnageants poolés constituent l'extrait méthanolique. Afin de concentrer l'extrait, le méthanol a été évaporé sous balayage d'azote et le contenu sec a été repris dans 2 mL de méthanol. Enfin, dans le but de se défaire de toute trace d'huile éventuellement récupérée avec le surnageant, l'extrait a été centrifugé une dernière fois à 2500 rpm durant 2 minutes.

Teneur totale en composés phénoliques par Folin-Ciocalteu

La teneur en composés phénoliques totaux des huiles peut être mesurée à l'aide d'un test spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu dont la coloration vire au bleu une fois réduit. Cette coloration bleue est donc proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait. Le protocole suivi est expliqué ci-après. Un volume de 0,1 mL d'extrait méthanolique a été mis en présence de 0,5 mL une solution de réactif de Folin-Ciocalteu (réactif de Folin & Ciocalteu 2 N, Sigma-Aldrich) dilué dix fois dans l'eau, et après deux minutes d'incubation, 2 mL d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ (VWR) 1,9 M afin d'augmenter le pH du milieu et ainsi colorer le réactif de Folin-Ciocalteu. Le tout a incubé 3 min à l'obscurité avant d'être soumis à une mesure spectrophotométrique ponctuelle à 760 nm. Le spectrophotomètre utilisé est un GE Healthcare Ultraspec 7000.

Cependant, ce test n'a pas pu être mené à bien étant donné la formation d'émulsion dès l'ajout d'une solution aqueuse. L'émulsion cause une interférence considérable rendant impossible la mesure d'absorbance du milieu réactionnel. Il en a été déduit que le problème était la molécule d'anéthol. En effet, celle-ci est présente dans les huiles⁸ et est responsable d'un phénomène appelé « l'effet ouzo », autrement dit de la formation d'une émulsion lors d'ajout d'eau. (Carteau et al., 2007) Afin de régler ce problème, l'ajout de solutions aqueuses doit être évité. Le réactif de Folin-Ciocalteu a donc été solubilisé dans l'acétone. En ce qui concerne la solution basique par contre, il n'a pas été possible d'en préparer une dans un autre solvant.

Profil en composés phénoliques par HPLC

Le profil en composés phénoliques d'un échantillon peut être étudié en séparant ceux-ci par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diode HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection). L'appareil utilisé est un Agilent 1200 Quaternary Pump 1 muni d'une colonne C18 Kinetex PFP 100 x 4,5 mm, 2,6 µm (Phenomenex) et d'un détecteur MWD (Multi Wavelength Detector). Les longueurs d'onde de mesure sont 250, 280, 315 et 370 nm (280 nm uniquement est suffisant). Un volume de 10 µL d'échantillon a été injecté. Un débit de solvant de 1,5 mL/min a été maintenu suivant le programme d'analyse présenté dans le tableau 12.

Tableau 12 : Programme de séparation des composés phénoliques par HPLC

t (min)	Solvant A :	Solvant B :
	H ₂ O + 0,1 % HFO	ACN + 0,1 % HFO
0	95	5
6	95	5
13	80	20
17	40	60
19	0	100
20	0	100
21	95	5
25	95	5

⁸ L'anéthol est un composant retrouvé dans les huiles essentielles des plantes étudiées. Cette molécule a été identifiée lors d'analyses par chromatographie en phase gazeuse des huiles étudiées (*cfr. Résultats et discussion : Profils en acides gras, p. 46*)

Afin de pouvoir interpréter les chromatogrammes, autant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, il faut disposer de standards purs. Les standards utilisés sont : acide férulique ($\geq 98\%$, Fluka), acide *p*-coumarique ($\geq 98\%$, Fluka), quercétine dihydratée ($\geq 98\%$, Fluka), rutine ($\geq 90\%$, Fluka), catéchine hydratée ($\geq 96\%$, Fluka), acide chlorogénique dihydraté ($\geq 98\%$, Fluka), acide caféique ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), acide sinapique ($\geq 97\%$, Fluka), acide cinnamique (Fluka) et lutéoline (Fluka).

Premièrement, des solutions de témoins seuls à 0,05 mg/mL ont été injectées afin de connaître leurs temps de rétention et pouvoir identifier les différents composés contenus dans l'échantillon. Ensuite, des solutions mix contenant les différents témoins à différentes concentrations sont injectées afin de pouvoir construire une droite d'étalonnage reliant l'aire sous les pics aux concentrations. En effet, chaque composé peut plus ou moins absorber à une certaine longueur d'onde et présenter une réponse différente, une droite d'étalonnage spécifique à chaque composé est donc nécessaire.

De plus s'est posé la question du choix d'un standard interne. En effet, étant donné la façon dont les extraits méthanoliques ont été obtenus, des pertes sont inévitables. L'utilisation d'un standard interne est dès lors indispensable pour procéder à une quantification précise. Pour cela, les extraits méthanoliques préparés comme expliqué ci-dessus sont injectés une première fois. Avant d'être injectés, les extraits ont été filtrés sur filtres de porosité de 0,2 μm (PTFE syringe filters 0,22 μm – 13 mm, ROCC). Le standard choisi est un composé phénolique non présent dans l'échantillon. De nouveaux extraits méthanoliques sont alors préparés selon la même méthodologie, avec ajout d'une quantité exactement connue de standard interne (petit volume d'une solution 1 mg/mL du standard choisi) juste après la pesée de l'huile. Le volume introduit est fonction de l'aire du pic obtenu lors de l'injection du témoin seul, afin que l'aire du pic de standard interne dans l'extrait finalement obtenu soit du même ordre de grandeur que ceux des composés phénoliques présents dans l'échantillon. Dans ce travail, 100 ou 200 μL d'une solution 1 mg/mL ont été ajoutés à l'huile.

Activité anti-oxydante

La mesure de l'activité antioxydante s'est faite par spectrophotométrie à l'aide du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Ce composé présente une coloration violette intense à l'état oxydé qui vire au jaune lorsqu'il est réduit. Cette décoloration est proportionnelle à l'activité antiradicalaire de l'extrait avec lequel il réagit. Elle est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde absorbée par le DPPH violet.

Afin de mesurer son activité antiradicalaire, l'extrait est dilué 100 fois dans du chloroforme. Un volume de 500 μL de cet extrait dilué sont mis en présence de 500 μL d'une solution de DPPH (Sigma-Aldrich) environ $2 \cdot 10^{-4}$ M dans du méthanol. Le milieu réactionnel incube 30 minutes à l'obscurité. Après cela, une mesure ponctuelle de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm est effectuée. Le spectrophotomètre utilisé est un GE Healthcare Ultraspec 7000 et le programme informatique d'analyse Resolution.

Le témoin de réaction positive met en présence 500 μL de chloroforme (grade analytique, Scharlau) et 500 μL de solution de DPPH et le témoin de réaction négative 500 μL d'une solution de trolox (acide (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique, Sigma-Aldrich) et 500 μL de solution de DPPH. En effet, le trolox est un antioxydant reconnu pouvant être utilisé comme référence.

Cette analyse a été répétée trois fois sur chacune des trois extractions de chaque graine de la façon suivante : une dilution a été préparée pour chaque extrait, puis trois répétitions de mise en présence de DPPH et de mesure spectrophotométrique a été effectuée sur chaque dilution.

L'activité antiradicalaire est exprimée de manière relative par comparaison à un antioxydant de référence. Tout d'abord l'absorbance corrigée est calculée, tenant compte des valeurs des deux témoins de réaction positive et négative. (Equation 6)

Équation 6 : Absorbance corrigée d'un échantillon

$$Abs_{corr} = \frac{Abs_{éch} - Abs_{réac.-}}{Abs_{réac+} - Abs_{réac.-}}$$

Ensuite, l'activité antiradicalaire a été calculée selon l'équation 7 suivante :

Équation 7 : Activité antiradicalaire d'un échantillon

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = \left(\frac{Abs_{corr, réac+} - Abs_{corr, éch}}{Abs_{corr, réac+}} \right) \times 100$$

4. Traitements statistiques des résultats

Les moyennes et écarts-types ont été calculés à l'aide du programme Microsoft Excel.

Les traitements statistiques des données consistent en des comparaisons de moyennes. Celles-ci ont été effectuées à l'aide du logiciel Minitab 17. L'égalité des moyennes a été testée par analyse de la variance à un facteur avec un $\alpha = 0,05$ (les facteurs étant successivement le rendement massique, la concentration en acides gras, en stérols et l'activité antioxydante). Les structurations de moyennes ont été déterminées par comparaison de Fisher. Pour s'assurer de la validité des conclusions obtenues, les conditions d'application de normalité des populations et d'égalité de leurs variances ont été vérifiées par test de Ryan-Joiner et d'analyse de la variance respectivement.

Afin de comparer les graines entre elles, les résultats obtenus pour chaque méthode d'extraction ont été comparés individuellement. Ensuite, l'impact des méthodes d'extraction a été étudié en comparant les résultats obtenus pour chacune d'entre elles, séparément pour chaque graine.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Teneur en matière sèche des graines

Les graines de fenouil sont constituées de $93,173 \pm 0,097$ g de matière sèche sur 100 g de matière fraîche, les graines d'anis vert de $94,479 \pm 0,061$ g/100 g et celles de carvi de $94,135 \pm 0,050$ g/100 g.

2. Extractions des huiles

Généralités

Les rendements massiques d'extraction des huiles ont été calculés sur base des trois répétitions effectuées pour chacune des méthodes d'extraction. Le graphique suivant (Figure 17) illustre les moyennes et écarts-types obtenus sur matière fraîche à partir de ces trois répétitions. Un tableau reprenant les valeurs exactes sur matière fraîche et sur matière sèche est présenté en annexe. (Annexe 2)

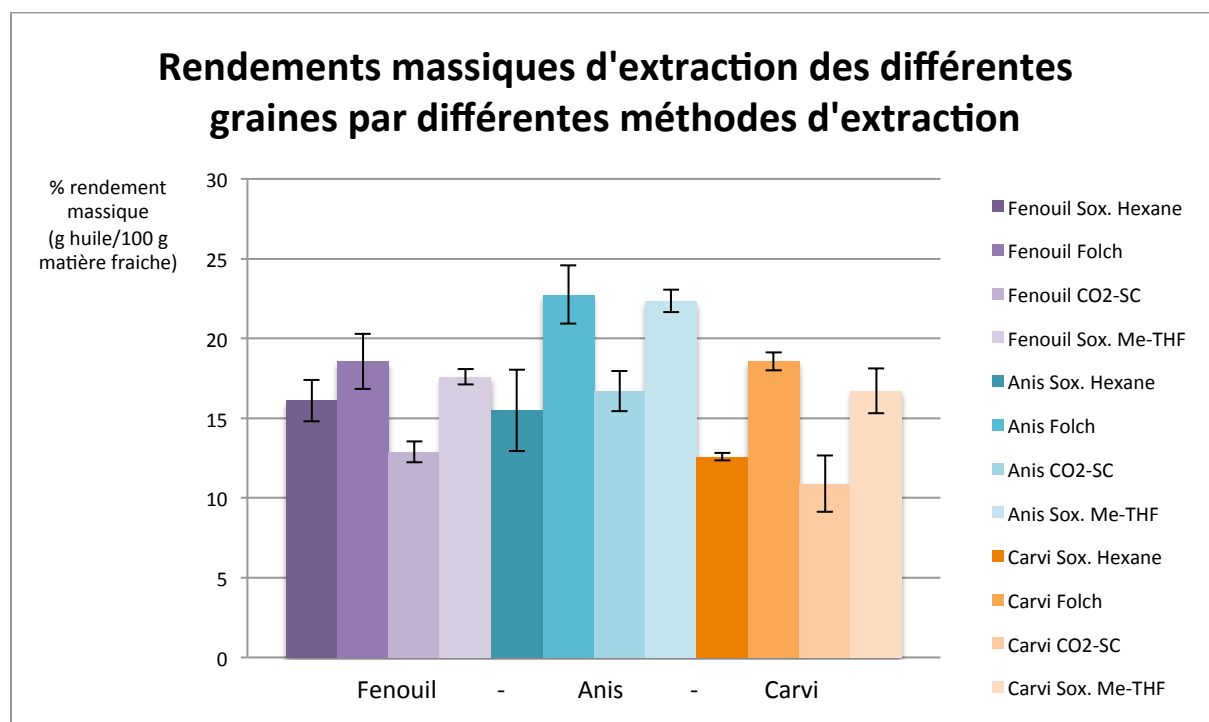


Figure 17 : Rendements massiques d'extraction des huiles des différentes graines par les différentes méthodes d'extraction

Sur base de ce graphique, il paraît évident que les rendements massiques d'extraction présentent des différences autant en fonction des graines que des méthodes d'extraction. Néanmoins, les rendements se situent toujours aux alentours de 10 à 20 % (g d'huile pour 100 g de graines fraîches). Cela correspond aux données récoltées dans la littérature. En effet, (Kleiman et al., 1982), (Malhotra, 2012a), (Rather et al., 2016), (Özgülven, 2012) et (Khan et al.,

2016a) présentent tous des teneur en lipides allant de 10 à 25 % pour les graines de ces trois plantes (voir ci-dessous).

Comparaison des plantes

Indépendamment de la méthode d'extraction, les graines d'anis semblent renfermer plus d'huile que celles de fenouil, puis celles de carvi. Les études statistiques⁹ confirment que les graines d'anis délivrent significativement plus d'huile que celles de fenouil et de carvi qui, quant à elles, ne présentent pas des teneurs significativement différentes. Ces conclusions ont pu être tirées pour chacune des méthodes d'extractions (mis à part pour le Soxhlet à l'hexane pour lequel les moyennes ne sont pas significativement différentes). Pour la méthode de Folch, qui semble être la plus efficace pour extraire les lipides, les graines d'anis contiennent jusqu'à $22,7 \pm 1,8$ g d'huile par 100 g de graines fraîches, alors que 100 g de graines de fenouil et de carvi ne donnent que $18,6 \pm 1,7$ g et $18,6 \pm 0,6$ g d'huile.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Kleiman et al., 1982) qui attribuent aux graines d'anis vert une teneur en lipides de 24 % (g/100 g matière sèche), 24 % aux graines de fenouil et à celles de carvi de 19 %. D'autres travaux ont également mesuré les teneurs en huiles de ces plantes. (Malhotra, 2012a) attribue une teneur en lipides de 14,9 g et (Rather et al., 2016) de 10 g par 100 g de graines de fenouil, (Özgülven, 2012) 8 à 16 g/100 g pour les graines d'anis et (Khan et al., 2016b) 14,6 g/100 g pour les graines de carvi.

Comparaison des méthodes d'extraction

En ce qui concerne la comparaison des méthodes d'extraction, celles présentant les meilleurs rendements en huiles sont la méthode conventionnelle de Folch et la méthode alternative de Soxhlet utilisant le 2-méthyltétrahydrofurane comme solvant. Celles-ci délivrent des rendements significativement supérieurs aux deux autres méthodes et ne sont entre elles pas significativement différentes. De même, le Soxhlet à l'hexane et l'extraction au CO₂ supercritique ne présentent pas de différences significatives entre elles.

Pour les trois types de graines, l'extraction par Soxhlet à l'agro-solvant abouti à des rendements massiques en huile supérieurs à ceux obtenus avec par Soxhlet à l'hexane, qui est le solvant classiquement utilisé pour l'extraction de lipides. Les valeurs appuyant ces propos sont des rendements en huile de $17,6 \pm 0,5$ g/100 g graines fraîches pour l'extraction d'huile de fenouil au MeTHF comparativement à $16,1 \pm 1,3$ g/100 g pour l'hexane, $22,4 \pm 0,7$ g/100 g comparativement à $15,5 \pm 2,6$ g/100 g pour l'anis et $16,7 \pm 1,4$ g/100 g comparativement à $12,6 \pm 0,2$ g/100 g en ce qui concerne le carvi. Ces résultats sont encourageants étant donné l'objectif de ce travail qui est de trouver une méthode d'extraction des huiles alternative aux méthodes conventionnelles. En effet, ils montrent que l'agro-solvant 2-méthyltétrahydrofurane est plus efficace que l'hexane pour l'extraction des lipides. (Breil et al., 2016) ont travaillé sur différents éco-solvants pour extraire les lipides de levures. Dans leurs travaux, les rendements massiques d'huile récupérée avec l'extraction au MeTHF sont supérieurs à ceux obtenus avec l'hexane ($15,94 \pm 0,44$ g/100 g et $14,03 \pm 0,67$ g/100 g respectivement).

⁹ Un tableau récapitulatif reprenant les résultats des analyses statistiques effectuées est annexé au travail. (Annexe 19)

Les quantités d'huile obtenues au CO₂ supercritique sont par contre les plus faibles. Cela peut être dû au fait que la durée d'extraction est plus courte que pour les autres méthodes. En effet, cette méthode d'extraction n'est pas encore totalement optimisée. Les rendements obtenus semblent cependant plus élevés que ceux référés dans la littérature. (Zekovic et al., 2016) ont obtenu pour meilleur rendement massique 7,16 g d'huile pour 100 g de graines de coriandre, qui appartient également à la famille botanique des Apiacées.

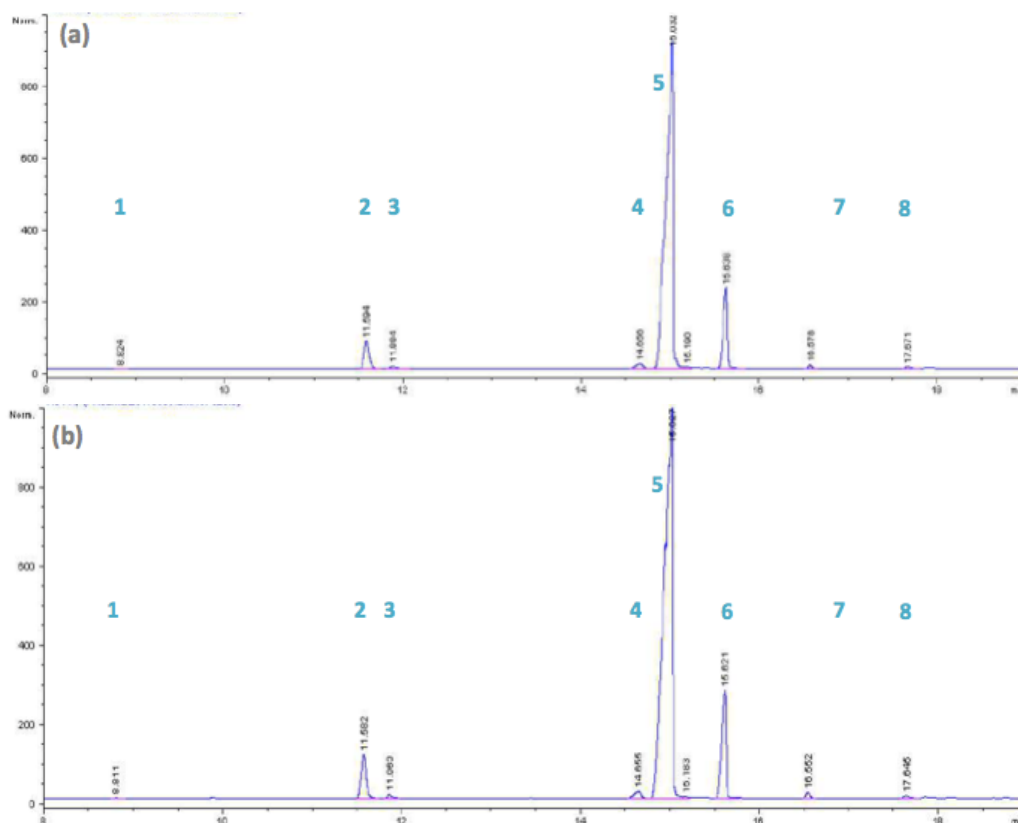
Cependant, ces résultats ne sont que des premiers résultats, les compositions et activités antioxydantes de ces extraits sont également des informations décisives dans le choix de l'une ou l'autre méthode, en fonction de l'application à laquelle l'huile est destinée.

3. Caractérisation des huiles

Profils en acides gras

Fenouil

Des exemples de chromatogrammes obtenus pour la séparation des esters méthyliques d'acides gras des huiles extraites par les quatre méthodes d'extraction différentes sont présentés dans la figure 18 ci-dessous.



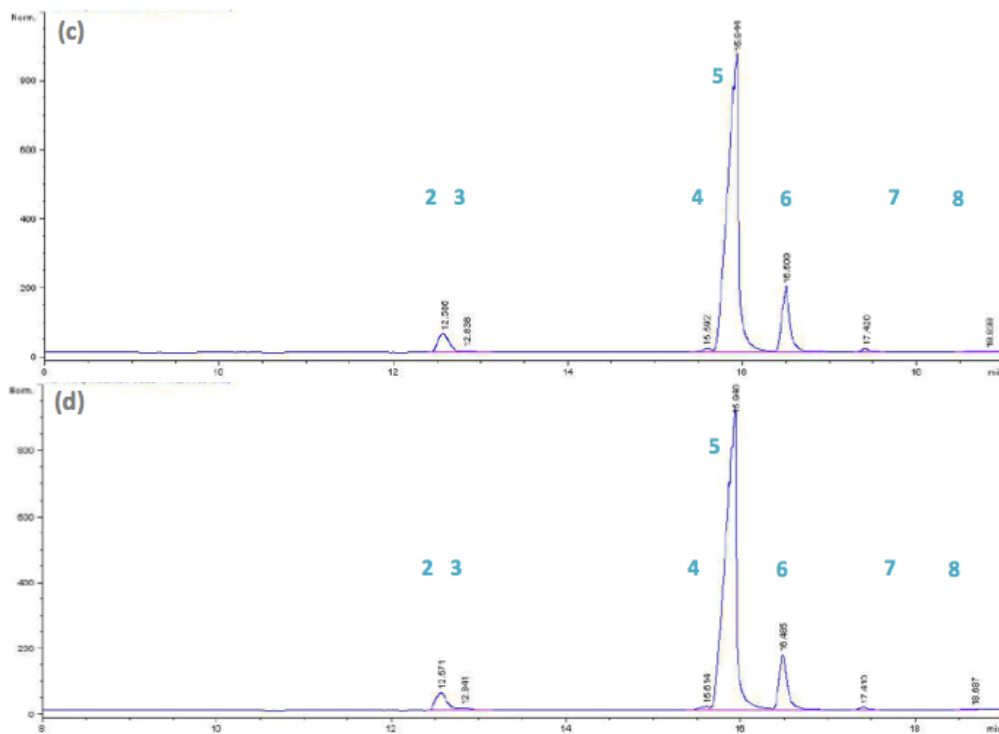


Figure 18 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites de fenouil (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO₂ supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane

Les pics identifiés correspondent aux esters méthyliques des acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0.

La simple observation de ces chromatogrammes donne déjà plusieurs informations.

Premièrement, les huiles extraites contiennent des acides gras de chaînes allant de 14 à 20 atomes de carbone. Il apparaît également très clairement que les acides gras les plus abondants sont ceux possédant des chaînes à 18 atomes de carbone et une insaturation, suivis des C18 présentant deux insaturations, puis des C16 saturés. Les autres acides gras identifiés sont présents en moindres quantités.

Ensuite, l'allure de ces quatre chromatogrammes est toujours similaire, ce qui laisserait vouloir dire que la méthode d'extraction n'affecterait pas ou peu les profils en acides gras de l'huile, d'un point de vue relatif.¹⁰

Enfin, il est à noter que les chromatogrammes présentent également des pics correspondant à des composés autres que des acides gras. Les huiles obtenues par la méthode conventionnelle de Soxhlet à l'hexane sont les plus concernées par ces autres pics. Cette méthode serait donc moins sélective et extrairait un plus large panel de molécules. Des composés issus des huiles essentielles des plantes ont entre autre été identifiés grâce aux spectres de masse. L'anéthol, le composé majeur de l'huile essentielle de graine de fenouil a été identifié à un temps de rétention de 6,9 min. L'anisole, un fragment de cette dernière molécule, reconnu par son pic à 5,6 min, est présent en quantités non négligeables dans les huiles. Un chromatogramme présentant ces pics est annexé au travail. (Annexe 3) Les méthodes d'extraction utilisées visant à extraire les composés apolaires, il est normal de retrouver des composés de l'huile essentielle dans les huiles extraites.

¹⁰ Pour rappel, les résultats ont été interprétés de manière relative, comme expliqué précédemment. Cependant, une analyse avec standard interne a été effectuée par la suite.

Comme expliqué dans la partie matériel et méthode, les résultats ont été traités de manière relative. Le tableau 13 ci-dessous reprend les moyennes et écarts-types des contributions de chaque acide gras identifié aux teneurs totales en acides gras des huiles de fenouil. Il reprend également les valeurs retrouvées dans la littérature.

Tableau 13 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites de fenouil

Acide gras	Soxhlet hexane (%)	Folch (%)	CO ₂ -SC (%)	Soxhlet MeTHF (%)	(Kleiman et al., 1982; Kooti et al., 2015)
C14:0	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	-	-	-
C16:0	4,96 ± 0,12	5,29 ± 0,07	5,12 ± 0,17	5,06 ± 0,062	4 et 5
C16:1	0,44 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,73 ± 0,022	-
C18:0	1,37 ± 0,03	1,40 ± 0,03	0,96 ± 0,14	0,87 ± 0,037	1,2
C18:1	80,93 ± 0,39	80,72 ± 0,15	80,12 ± 0,23	82,00 ± 0,15	n-12 : 60 et 72,9 n-9 : 22 et 8,7
C18:2	11,31 ± 0,23	11,21 ± 0,05	12,10 ± 0,10	11,10 ± 0,14	14 et 11
C18:3	0,51 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,45 ± 0,01	-
C20:0	0,37 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,06	0,21 ± 0,04	-

Les proportions d'acides gras obtenues lors des analyses sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature.

Tous les extraits de fenouil contiennent environ 80 % de C18:1. Il est à noter que les acides gras C18:1 sont présents sous formes de différents isomères de position dans les huiles obtenues. En effet, comme exprimé dans la partie bibliographique, l'acide pétrosélinique, (18:1 n-12) est l'acide gras majoritaire des plantes issues de la famille des Apiacées. Les graines contiennent également de l'acide oléique (C18:1 n-9). La colonne utilisée pour la séparation des EMAG mesurant 30 m seulement, elle ne permet pas une bonne séparation de ces isomères très semblables. Il est possible sur certains chromatogrammes d'observer une séparation du pic C18:1, mais cela n'est pas toujours le cas. Lorsque c'est le cas, les pics peuvent être intégrés manuellement. L'annexe 4 montre une séparation de pic C18:1 bien résolue.

L'extraction par Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane extrait une proportion très légèrement mais significativement plus élevée de C18:1 (82 %). Quant à l'extraction au CO₂ supercritique, elle donne des huiles contenant significativement légèrement moins de C18:1, mais significativement légèrement plus de C18:2 et C18:3. C'est d'ailleurs la méthode qui délivre les huiles les plus riches en C18:2. En règle général, les C18:2 représentent 11 à 12 % de la teneur totale en acides gras, ce qui en fait les deuxième acides gras les plus abondants des huiles de fenouil. Les huiles proportionnellement les plus pauvres en C18:2 sont celles obtenues par Folch et Soxhlet au MeTHF. En ce qui concerne l'acide stéarique (C18:0), des proportions plus élevées semblent être obtenues avec les méthodes d'extraction conventionnelles. Cependant, il est difficile d'affirmer la significativité de ces différences étant donné que les conditions d'application du test statistique d'analyse de la variance ne sont pas respectées.

L'acide palmitique (C16:0) est le troisième acide gras le plus important en termes de proportion. Il compte toujours pour environ 5 % de la teneur totale. Sa proportion est plus élevée dans les huiles obtenues par les méthodes de Folch, suivies de celles au CO₂ supercritique. Sa proportion est la plus faible dans les huiles obtenues par Soxhlet au MeTHF. L'acide gras insaturé à 16 atomes de carbone représente dans toutes les huiles moins de 1 % de la totalité des acides gras.

L'acide myristique (C14:0) n'a pas été détecté lors des analyses des extraits obtenus par les méthodes d'extraction alternatives. Cela peut être expliqué par le fait que ces derniers ont été injectés des semaines plus tard sur la colonne. Entre temps, des triglycérides non estérifiés se sont accumulés en tête de colonne, provoquant une résolution diminuée (décalage des temps de rétention et aplatissement des pics). Les pics plus aplatis n'ont donc pas été détectés mais l'acide myristique est bien présent dans ces extraits (*cfr. Teneurs en acides gras p. 53-54*).

Les méthodes alternatives conduisent également à des proportions plus faibles en acide arachidique (C20:0).¹¹

Anis vert

Un profil d'acides gras obtenu par chromatographie pour un extrait d'anis vert obtenu par Soxhlet à l'hexane est présenté dans la figure 19 ci-dessous. Les chromatogrammes correspondants aux huiles extraites par les différentes méthodes d'extraction ne sont pas présentés ici car ils sont peu différents. Ils sont tout de même annexés au travail. (Annexe 5)

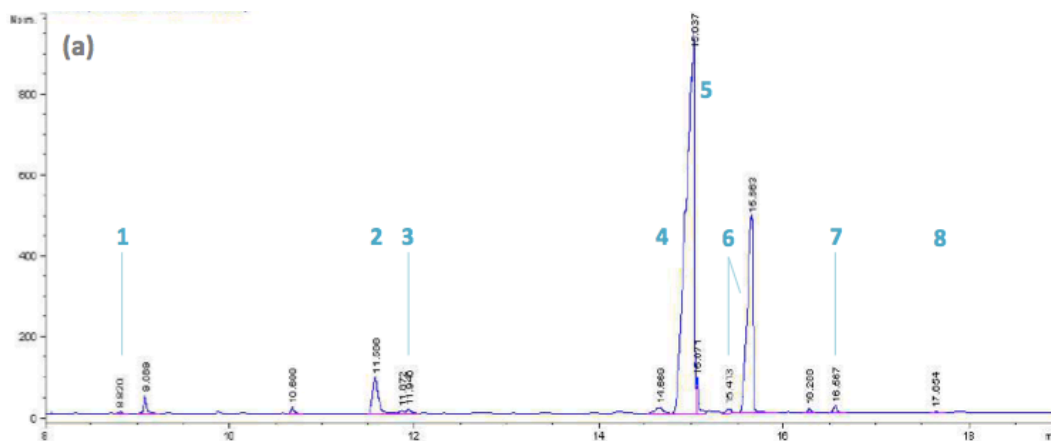


Figure 19 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite d'anis vert par la méthode de Soxhlet à l'hexane

Les pics identifiés correspondent aux esters méthyliques des acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0.

Les acides gras C18:1 sont les plus abondants, suivis des C18:2. Les C16:0 sont également présents mais en plus faible quantité, ainsi que les C14:0, C16:1, C18:0, C18:3 et C20 en plus faibles quantités encore.

¹¹ Le pic correspondant à l'acide arachidique n'est pas toujours bien résolu. Il forme parfois un pic très aplati avec d'autres composés et a donc dû être intégré manuellement. L'intégration n'est dès lors pas toujours très précise.

Le tableau 14 suivant reprend les moyennes et écarts-types des concentrations relatives en acide gras des huiles d'anis vert, ainsi que les valeurs retrouvées dans la littérature.

Tableau 14 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites d'anis vert

Acide gras	Soxhlet hexane (%)	Folch (%)	CO ₂ -SC (%)	Soxhlet MeTHF (%)	(Kleiman et al., 1982; Özgüven, 2012)
C14:0	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,04	-	-	-
C16:0	4,31 ± 0,03	4,78 ± 0,19	4,81 ± 0,51	4,12 ± 0,02	5 et 10
C16:1	0,51 ± 0,11	0,60 ± 0,02	0,86 ± 0,08	0,73 ± 0,04	-
C18:0	0,95 ± 0,01	1,11 ± 0,17	0,80 ± 0,04	0,65 ± 0,02	-
C18:1	70,23 ± 0,22	69,67 ± 0,33	68,37 ± 0,99	70,42 ± 0,09	n-12 : 50 et 70 n-9 : 22 et 28
C18:2	23,25 ± 0,15	22,99 ± 0,34	24,32 ± 0,41	23,36 ± 0,07	5 et 21
C18:3	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,69 ± 0,06	0,55 ± 0,02	-
C20:0	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,03	-

Les acides C18:1 représentent dans les huiles d'anis environ 70 % de la composition totale en acides gras et les C18:2 de 23 à 24 %. Les proportions les plus élevées en C18:1 sont obtenues avec les extractions à chaud. Comme pour les huiles de fenouil, l'extraction au CO₂-SC délivre des huiles proportionnellement légèrement moins riches en C18:1, mais également légèrement plus riches en acides gras C18 polyinsaturés. Les huiles les plus pauvres en C18:2 sont celles obtenues par les méthodes conventionnelles. L'acide stéarique (C18:0) compte pour environ un centième de la composition totale en acides gras. Il semble plus important dans les huiles extraites par la méthode de Folch.

La proportion en acide palmitique (C16:0) est légèrement inférieure à 5 %. Elle est significativement plus élevée avec les extractions par Folch et au CO₂-SC. L'acide gras C16:1 est présent en très faible proportion dans les différents extraits, représentant moins de 1 %.

L'acide myristique (C14:0) est présent en très faibles proportions et n'est pas non plus détecté pour les huiles obtenues par les méthodes alternatives. L'acide arachidique (C20:0) représente également de faibles pourcentages. Les contributions de ces deux acides à la composition totale en acides gras ne dépassent pas non plus 1 %.

Carvi

Un profil chromatographique en acides gras d'une huile de carvi obtenue par Soxhlet à l'hexane est présenté dans la figure 20 ci-dessous. Les chromatogrammes des huiles obtenues par les autres méthodes sont présentés dans l'annexe 6.

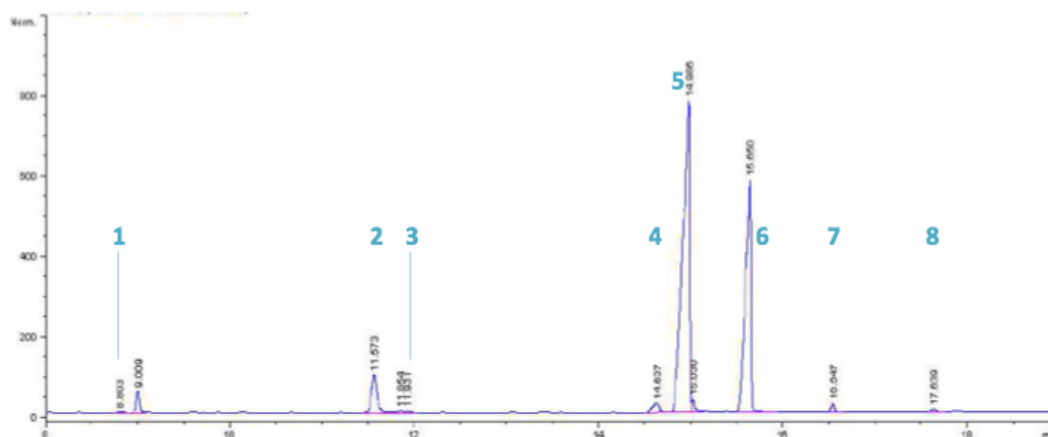


Figure 20 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite de carvi par la méthode de Soxhlet à l'hexane

Les pics identifiés correspondent aux esters méthyliques des acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0.

L'acide C18:1 est toujours le plus abondant, mais la différence de proportion avec l'acide C18:2 est moins élevée. L'acide palmitique est toujours le troisième acide gras le plus abondant et les autres acides gras sont présents en plus faibles proportions.

Les moyennes et écarts-types des pourcentages en acides gras sont présentés dans le tableau 15, qui reprend également les valeurs trouvées dans la littérature.

Tableau 15 : Pourcentages relatifs des différents acides gras par rapport à la teneur totale dans les huiles extraites de carvi

Acide gras	Soxhlet hexane (%)	Folch (%)	CO ₂ -SC (%)	Soxhlet MeTHF (%)	(Kleiman et al., 1982; Khan et al., 2016a)
C14:0	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,05	-	-	-
C16:0	5,31 ± 0,04	5,73 ± 0,16	5,33 ± 0,02	5,03 ± 0,03	4 et 5
C16:1	0,20 ± 0,02	0,29 ± 0,07	0,66 ± 0,03	0,61 ± 0,02	-
C18:0	1,79 ± 0,02	1,97 ± 0,17	1,51 ± 0,11	1,23 ± 0,09	1
C18:1	58,13 ± 0,12	58,53 ± 0,31	57,88 ± 0,21	59,08 ± 0,10	n-12 : 30 et 43 n-9 : 15 et 25
C18:2	33,21 ± 0,04	32,31 ± 0,10	33,34 ± 0,21	33,14 ± 0,04	34 et 37
C18:3	0,87 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,88 ± 0,02	0,68 ± 0,02	-
C20:0	0,37 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,19 ± 0,04	-

Les extraits de carvi contiennent un peu moins de 60 % de C18:1 et un peu plus de 30 % de C18:2. Une fois de plus, les huiles obtenues à l'aide de 2-méthyltétrahydrofurane sont significativement proportionnellement plus riche en C18:1. Inversement, et comme pour les deux autres graines, l'extraction au CO₂ supercritique donne une huile contenant proportionnellement un peu moins de C18:1 mais légèrement plus de C18:2 et 18:3. L'huile proportionnellement la moins riche en C18:2 est celle obtenue par la méthode de Folch. L'acide stéarique représente dans toutes les huiles environ 1 à 2 % de la composition en acides gras totaux.

L'acide palmitique compte pour environ 5 % de la totalité des acides gras. La méthode de Folch semble donner des huiles contenant proportionnellement légèrement plus d'acide palmitique que les autres méthodes, mais cela ne peut être affirmé car les conditions d'application des tests statistiques ne sont pas vérifiées.

L'acide myristique et l'acide arachidique sont présents en faibles proportions dans toutes les huiles, ne représentant même pas 1 % de la composition totale en acides gras.

Comparaison des plantes

Le graphique ci-dessous (Figure 21) est une manière plus visuelle de représenter les pourcentages moyens des acides gras retrouvés dans les différentes huiles.

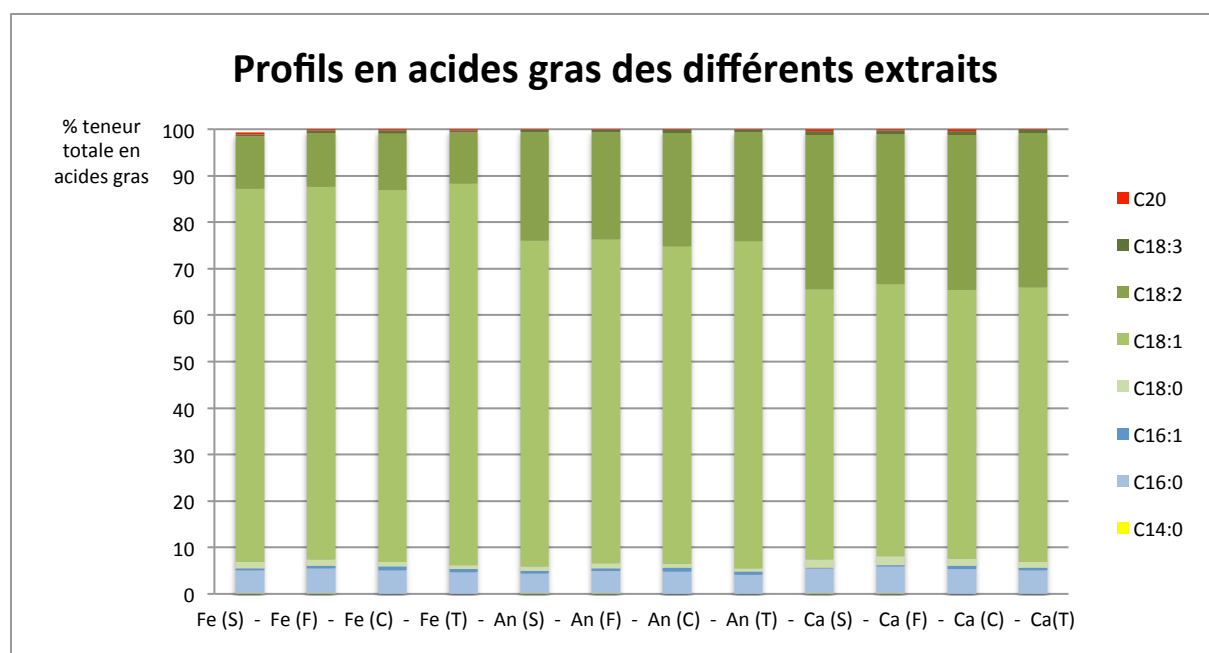


Figure 21 : Profils en acides gras des différents extraits lipidiques des graines de fenouil, anis vert et carvi
Fe : fenouil, An : anis vert, Ca : carvi, et (S) : Soxhlet à l'hexane, (F) : Folch, (C) : CO2-SC et (T) : Soxhlet au MeTHF

Dans les trois graines, les acides gras C18:1 représentent la majorité des acides gras totaux. En effet, l'acide gras pétrosélinique (C18:1 n-12) est l'acide gras majoritaire caractéristique de la famille des Apiacées. Cela a été confirmé par de nombreux travaux effectués sur les plantes de cette famille botanique. (Kleiman et al., 1982; Malhotra, 2012a, 2012b; Özgüven, 2012; Rather et al., 2016) attribuent tous des contributions de cet acide gras particulier aux AGT allant de 30 à 43 % pour le carvi, 50 à 70 % pour l'anis vert et 60 à 73 % pour le fenouil. La proportion en C18:1 contenus dans les huiles des différentes graines est donc un critère de comparaison intéressant. Les graines de fenouil en contiennent proportionnellement significativement plus que les graines d'anis, qui à leur tour en contiennent plus que celles de carvi. Inversement, le carvi contient proportionnellement significativement plus de C18:2 que l'anis et que le fenouil. Il peut également être observé que la proportion en C18 entre les différentes graines est constante. En effet, dans toutes les graines, les acides gras C18 saturés et insaturés représentent plus de 90 % de la composition totale en acides gras, et lorsqu'une plante contient moins de C18:1 (60 à 80 %), ceux-ci sont compensés par les C18:2, qui représentent toujours le deuxième acide gras en termes de quantité (10 à 30 %).

Ensuite, le troisième acide gras le plus abondant est l'acide palmitique (C16:0) avec environ 5 % pour les trois graines. Celui-ci est faiblement mais significativement plus abondant dans les huiles de carvi que de fenouil et significativement encore moins abondant dans celles d'anis.

Les acides gras C18:0 et C18:3 sont présents en moindres quantités. L'acide stéarique (C18:0) compte toujours pour environ 1 % de la composition totale en acides gras. Il semble plus élevé dans les huiles de carvi que dans celles de fenouil, l'huile d'anis étant la plus pauvre en cet acide gras. Cependant, aucune conclusion statistique ne peut être tirée étant donné la non-vérification des conditions d'application des tests. L'acide gras C18:3 est présent en des proportions légèrement plus faibles. Les huiles de carvi sont significativement relativement plus riches en C18:3 que les huiles d'anis et de fenouil.

Le rapport entre les acides gras insaturés et saturés peut constituer un autre critère de comparaison. Les huiles des trois graines contiennent toute dix à vingt fois plus d'acides gras insaturés que d'acides gras saturés. L'anis présente les rapports les plus élevés, suivi du fenouil puis du carvi.

Il est judicieux de rappeler que tous ces résultats ne peuvent être comparés que de façon relative. Ils ne donnent aucune information quant à la teneur totale en acides gras des huiles. L'huile d'une certaine graine peut contenir proportionnellement moins d'acide gras C18:1 qu'une autre mais en contenir tout de même plus, si la teneur totale en acides gras est plus élevée. C'est pourquoi de nouvelles analyses ont été effectuées ultérieurement avec ajout d'un standard interne. Les résultats de celles-ci sont abordés dans le point suivant « Teneurs en acides gras ».

Comparaisons des méthodes d'extraction

La composition relative en acides gras des huiles ne semble être que peu affectée par la méthode d'extraction. Quelques légères différences peuvent cependant être observées.

En ce qui concerne l'acide gras majoritaire C18:1, son extraction est favorisée par le MeTHF. En effet, ces huiles contiennent des teneurs significativement plus élevées en cet acide gras pour chaque type de graines. Cependant, cela ne semble pas en accord avec les travaux de (Breil et al., 2016) qui retrouvent une proportion légèrement moindre en C18:1 dans les extraits obtenus au MeTHF comparativement à ceux obtenus à l'hexane. Le CO₂-SC semble par contre extraire moins de C18:1 que les autres acides gras car ces huiles en sont toujours significativement proportionnellement les plus pauvres. Pourtant, selon (Sahena et al., 2009), la teneur en C18:1 est augmentée lors d'extraction par CO₂-SC en comparaison avec une extraction par Soxhlet.

Les extractions au CO₂-SC permettent un recouvrement plus élevé pour les autres acides gras à 18 atomes de carbone. Les acides gras C18:2 semblent proportionnellement plus importants dans les huiles obtenues à l'aide de CO₂ supercritique. Il n'est cependant pas possible de l'affirmer en termes de statistiques car les conditions d'application du test ne sont pas vérifiées. Les méthodes de Folch et de Soxhlet au MeTHF semblent quant à elles donner des huiles proportionnellement plus pauvres en C18:2. Pour l'acide stéarique, les conclusions statistiques ne sont pas non plus solides pour les mêmes raisons. Cependant, il semblerait que les huiles obtenues par Folch soient les plus riches en cet acide gras et celles obtenues par Soxhlet au MeTHF les plus pauvres. L'acide gras C18:3 est significativement plus important dans les huiles obtenues au CO₂-SC. Dans le cas du carvi, l'hexane donne des huiles à teneurs semblables. Les huiles les plus pauvres en C18:3 sont obtenues par Soxhlet au MeTHF.

Des proportions légèrement mais significativement supérieures en C16 sont retrouvées dans les huiles extraites par Folch. L'extraction au CO₂-SC la talonne, les huiles obtenues par cette méthode présentent des proportions significativement plus faibles dans le cas du fenouil et du carvi. La méthode donnant les huiles les plus pauvres en C16 est le Soxhlet au MeTHF.

Toutes ces différences sont minimales mais souvent significatives. Celles-ci s'expliquent sans doute par la polarité des solvants utilisés. Chaque acide gras possédant une polarité intrinsèque, il est plus ou moins soluble dans, et donc extractible par, un certain solvant.

Teneurs en acides gras

Etant donné que les compositions en acides gras ont déjà été développées précédemment en termes de proportions, il est surtout intéressant d'aborder ici la teneur totale en acides gras des différentes huiles. En effet, une extraction pourrait favoriser l'extraction des acides gras plus qu'une autre et donner des huiles plus riches en acides gras.

Fenouil

Les chromatogrammes obtenus pour les analyses avec standard interne (triglycérides de C17) sont les mêmes que ceux obtenus lors des analyses précédentes, si ce n'est qu'ils contiennent un pic supplémentaire, correspondant à l'ester méthylique d'acide gras C17. Le profil d'une huile de fenouil extraite par Soxhlet à l'hexane est présenté dans la figure 22.

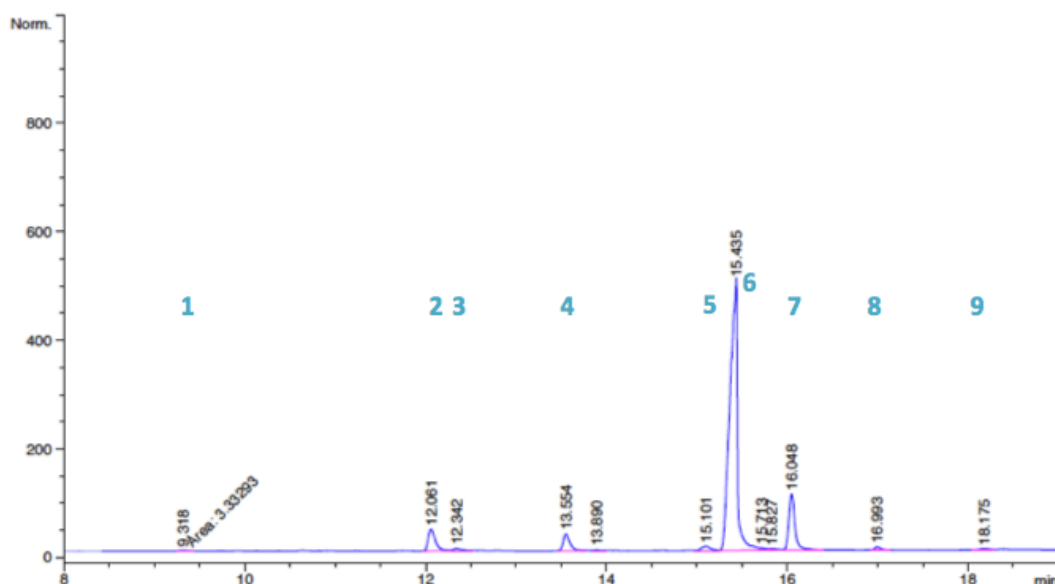


Figure 22 : Chromatogramme de séparation des EMAG d'une huile extraite de fenouil par la méthode de Soxhlet à l'hexane.

Les pics identifiés correspondent aux acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C17:0, (5) C18:0, (6) C18:1, (7) C18:2, (8) C18:3 et (9) C20:0.

Les méthodes d'extraction alternatives donnent des huiles significativement plus riches en acides gras que les méthodes conventionnelles. En effet, les huiles obtenues à l'aide de 2-méthyltétrahydrofurane contiennent $896,68 \pm 35,74$ mg d'acides gras totaux par g d'huile et celles obtenues au CO_2 supercritique $827,84 \pm 110,02$ mg/g, alors que les huiles obtenues par Soxhlet à l'hexane et par la méthode de Folch en contiennent $706,02 \pm 43,24$ mg/g et $744,36 \pm 35,01$ mg/g respectivement. Les teneurs des huiles obtenues par CO_2 -SC et Folch ne sont cependant pas significativement différentes.

Un graphique et un tableau présentant les moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras présents dans les huiles sont annexés au travail pour des informations plus approfondies. (Annexes 7 et 8)

Anis vert

Dans le cas des huiles d'anis vert, les huiles issues des méthodes d'extraction alternatives sont également plus riches en acides gras totaux. Les huiles obtenues par MeTHF et au CO₂-SC présentent des teneurs en acides gras de $729,55 \pm 70,49$ mg/g huile et $756,294 \pm 145 \pm 07$ mg/g. Celles obtenues à l'hexane et par la méthode de Folch sont caractérisées par des teneurs de $669,85 \pm 32,95$ mg/g et $693,68 \pm 20,62$ mg/g. Cependant, dans ce cas, les différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

Un graphique et un tableau représentant et détaillant les valeurs exactes sont présentés dans les annexes 9 et 10.

Carvi

Une fois de plus, les méthodes d'extractions peuvent être classées dans le même ordre en termes de richesse en acides gras des huiles qu'elles délivrent. Les huiles obtenues au MeTHF contiennent $857,06 \pm 115,04$ mg d'acides gras par g d'huile, celles obtenues au CO₂-SC $837,38 \pm 104,05$ mg/g. Les huiles obtenues par les méthodes conventionnelles contiennent $739,01 \pm 37,34$ mg/g et $765,58 \pm 31,20$ mg/g pour le Soxhlet à l'hexane et le Folch. Néanmoins, les différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

Un graphique et un tableau des moyennes et écarts-types des résultats sont annexés. (Annexes 11 et 12)

Comparaison des plantes

Pour chaque type d'extraction, les huiles issues de carvi contiennent plus d'acides gras ($73,9 \pm 3,7$ à $85,7 \pm 11,5$ %) que celles de fenouil ($70,6 \pm 4,3$ à $89,7 \pm 35,7$ %) qui en contiennent à leur tour plus que celles d'anis vert ($67,0 \pm 3,3$ à $75,6 \pm 14,5$ %). Ces différences ne sont significatives que dans le cas des extraits obtenus par la méthode de Folch.

Comparaison des méthodes d'extraction

Dans les résultats présentés pour chaque type de graine, il ressort que les méthodes alternatives donnent des huiles plus riches en acides gras. En effet, malgré que les différences ne soient pas toujours significatives, le Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane est la méthode qui délivre toujours les huiles les plus riches en acides gras, suivi du CO₂ supercritique, du Folch puis de l'hexane. Ces résultats sont encourageant dans l'optique de remplacement des méthodes d'extraction conventionnelles.

Si la composition en acides gras plus détaillée est observée, le Soxhlet au MeTHF semble permettre une meilleure extraction des C18:1 (significatif dans le cas du fenouil seulement). Des quantités plus importantes des acides gras C18:2, C18:3, C18:0 et C16:0 sont retrouvées dans les huiles obtenues par CO₂ supercritique (significatif dans beaucoup de cas, mais pas systématiquement).

Teneurs et profils en stérols

Fenouil

Afin d'illustrer le type de profil en stérols des huiles de fenouil, les chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits sont repris dans la figure 23.

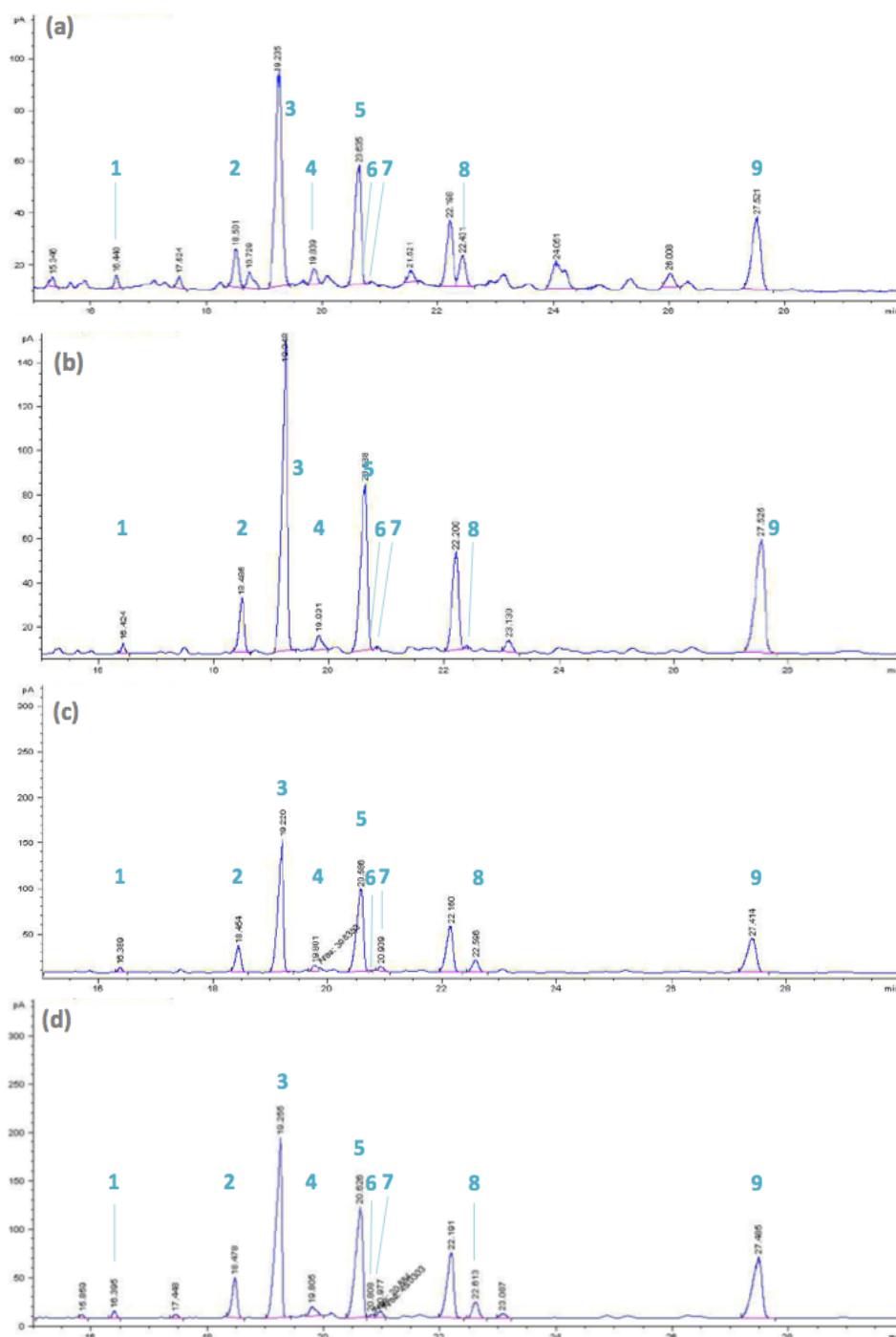


Figure 23 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits de fenouil obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO_2 -SC et (d) Soxhlet au MeTHF

Les pics identifiés correspondent au (1) cholestérol, (2) campesterol, (3) stigmasterol, (4) Δ^7 -campesterol, (5) β -sitostérol, (6) sitostanol, (7) Δ^5 -avenastérol, (8) Δ^7 -avenastérol et (9) bétuline, SI.

Comme pour les analyses d'acides gras, les chromatogrammes obtenus pour chaque type d'extraction présentent des profils similaires. Sept stérols et un stanol ont pu être identifiés dans les huiles de fenouil. Les deux stérols les plus abondants sont le stigmastérol et le β -sitostérol. L'huile de fenouil contient également du campestérol, du Δ^7 -avenastérol, du cholestérol, du sitostanol et du Δ^5 -avenastérol en plus faibles quantités. La figure 24 reprend les structures de ces composés.

Le pic caractérisé par un temps de rétention de 27,4 – 27,5 min correspond à la bétuline, stérol artificiel utilisé comme standard interne (figure 16). Celui sortant au temps de rétention 22,2 min n'a pas pu être identifié mais ne semble pas correspondre pas à un stérol.

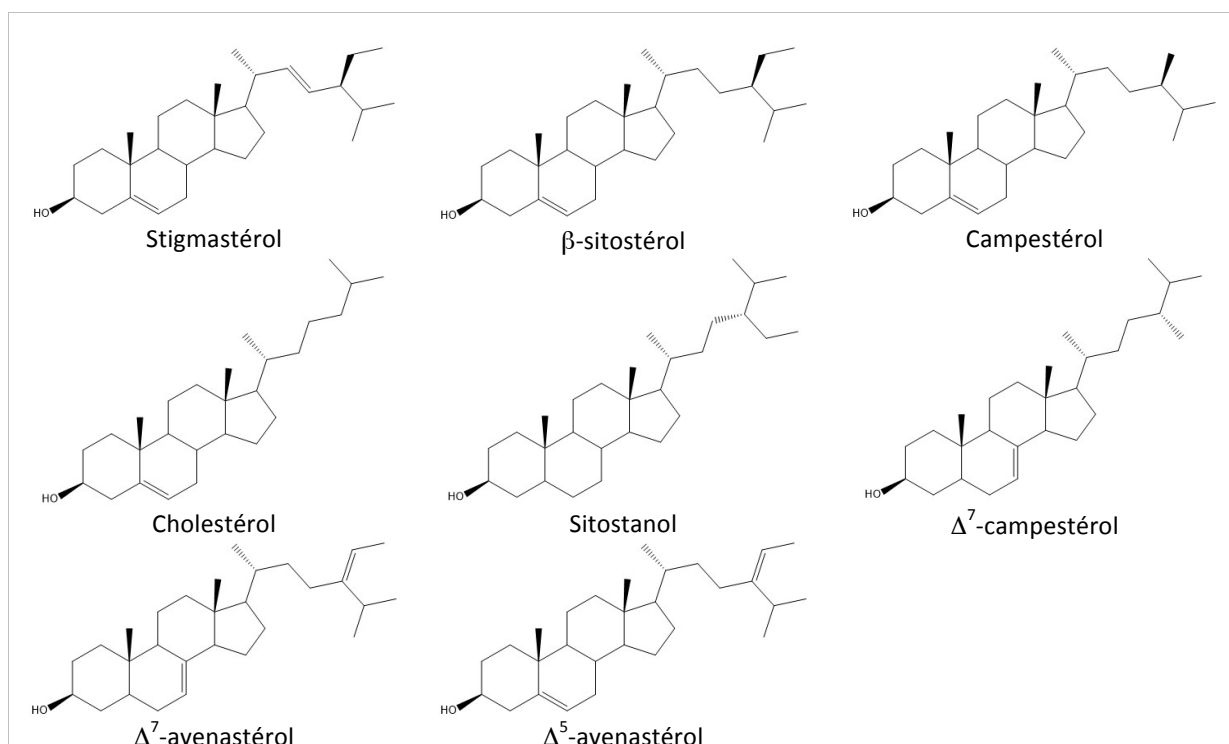


Figure 24 : Structure des stérols identifiés dans les huiles de fenouil (d'après (Winkler-Moser, n.d.))

La teneur totale en stérols des extraits a été déterminée par addition des teneurs individuelles de chaque stérol identifié. (Tableau 16)

Tableau 16 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles de fenouil

Méthode d'extraction	Teneur totale en stérols (mg/g huile)
Soxhlet à l'hexane	4,189 ± 0,295
Folch	3,272 ± 0,342
CO ₂ supercritique	4,640 ± 0,236
Soxhlet au Me-THF	3,652 ± 0,326

Les quantités de stérols retrouvées dans les huiles de fenouil varient assez fortement en fonction de la méthode d'extraction par laquelle elles ont été obtenues. La méthode donnant les huiles les plus riches en stérols est l'extraction au CO₂ supercritique. Les huiles obtenues par Soxhlet à l'hexane ne sont que légèrement moins riches en stérol (la différence n'étant significative que dans le cas du carvi). Les huiles obtenues par la méthode de Folch présentent quant à elles les teneurs en stérols les plus basses, celles obtenues par Soxhlet au MeTHF n'étant que faiblement plus élevées (également significatif dans le cas du carvi uniquement).

Au niveau des profils en stérols, le graphique ci-dessous (Figure 25) présente les moyennes et écart-types des quantités de stérols identifiés dans les différents extraits de graines de fenouil. Un tableau reprenant les valeurs de moyennes et écarts-types est annexé au travail. (Annexe 15)

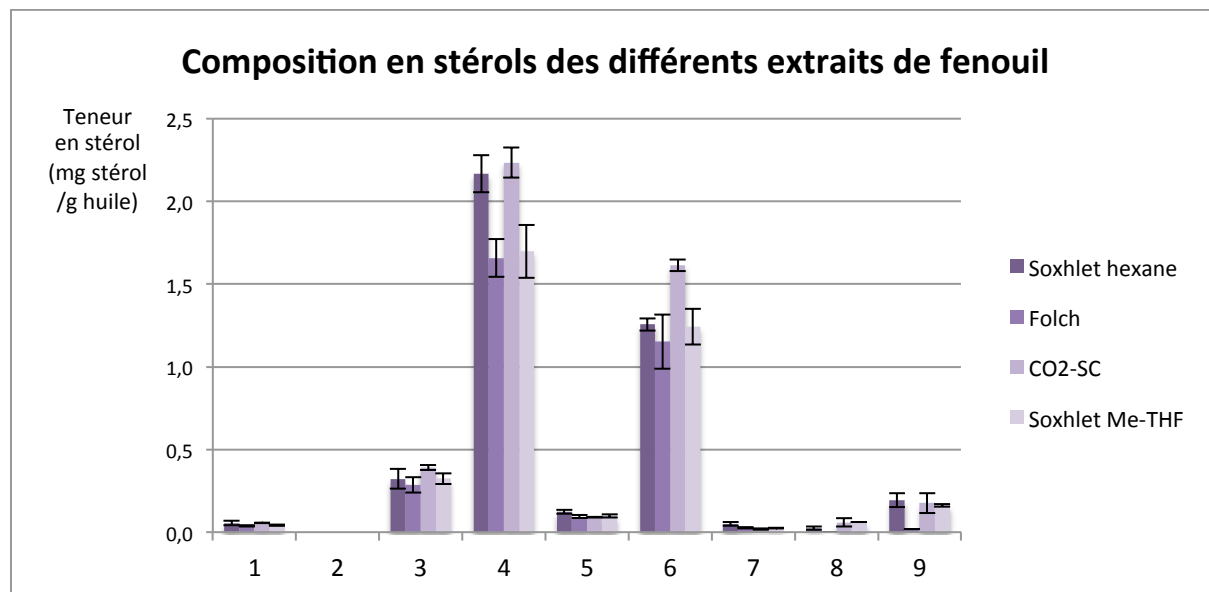


Figure 25 : Composition en stérols des extraits de fenouil : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3β-ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ⁷-campestérol, (6) β-sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ⁵-avenastérol et (9) Δ⁷-avenastérol

Le stigmastérol est le stérol le plus abondant avec des teneurs allant de $2,234 \pm 0,091$ mg par gramme d'huile pour l'extrait obtenu au CO₂ supercritique, qui semble être la méthode d'extraction donnant les huiles les plus riches en stérols. Indépendamment de la méthode d'extraction, le stigmastérol représente toujours la moitié de la teneur totale en stérols de l'huile de fenouil. Le second stérol le plus abondant est le β-sitostérol, qui compte pour un tiers des stérols totaux, avec une teneur de $1,6124 \pm 0,036$ mg/g huile pour l'extrait au CO₂ supercritique. Le campestérol est ensuite présent à une teneur allant jusque $0,392 \pm 0,016$ mg/g huile, toujours pour l'extrait au CO₂-SC. Il représente entre 7 et 9 % de la composition totale en stérols en fonction de la méthode d'extraction. Le Δ⁷-avenastérol et Δ⁷-campestérol présentent également des teneurs appréciables, $0,176 \pm 0,061$ et $0,091 \pm 0,003$ mg/g huile respectivement. Enfin, l'huile de fenouil contient également du cholestérol, du sitostanol et du Δ⁵-avenastérol mais en moindres quantités. Les mêmes stérols sont retrouvés dans le même ordre d'abondance avec les autres méthodes d'extraction, bien que celles-ci donnent des huiles moins riches en stérols.

Anis vert

Afin d'illustrer le type de profil en stérols de l'huile d'anis, un chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés de l'extrait de fenouil issu d'une extraction au CO₂ supercritique est présenté ci-dessous. (Figure 26) Un seul chromatogramme est présenté car, pour l'anis également, les profils sont similaires indépendamment de la méthode d'extraction. Une figure reprenant un chromatogramme pour chaque type d'extrait est tout de même annexé au travail. (Annexe 13)

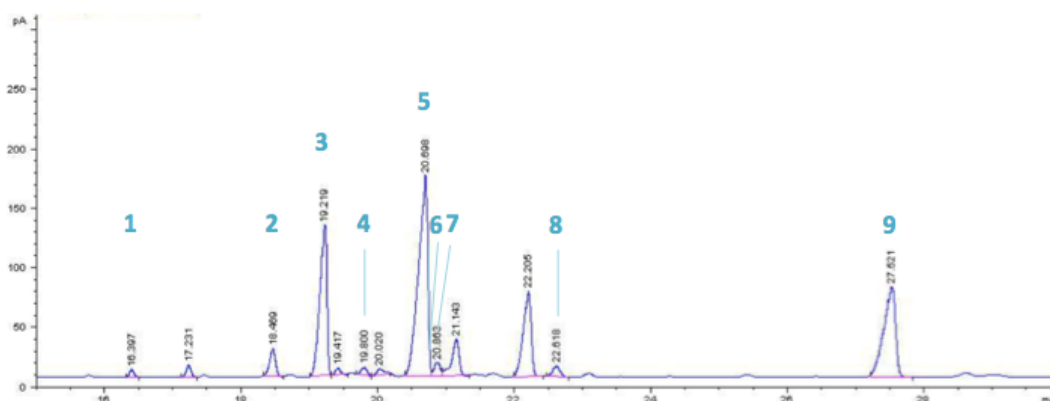


Figure 26 : chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés d'un extrait au CO₂-SC d'anis vert

Les pics identifiés correspondent au (1) cholestérol, (2) campestérol, (3) stigmastérol, (4) Δ⁷-campestérol, (5) β-sitostérol, (6) sitostanol, (7) Δ⁵-avenastérol, (8) Δ⁷-avenastérol et (9) bétuline, SI.

Les huit mêmes composés ont été identifiés dans les huiles d'anis vert. Le stigmastérol et le β-sitostérol sont les deux stérols les plus abondants, suivi par le campestérol, le Δ⁷-campestérol, le Δ⁷-avenastérol, le cholestérol, le Δ⁵-avenastérol et le sitostanol. Le β-sitostérol est dans les huiles d'anis plus important que le stigmastérol.

Les huiles sont plus ou moins riches en stérols en fonction de la méthode d'extraction utilisée. (Tableau 17) L'extraction au CO₂ supercritique est celle qui donne les huiles les plus riches en stérols. Elle est suivie du Soxhlet à l'hexane qui n'est pas significativement différent. Le Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane est significativement moins efficace que le CO₂ supercritique pour extraire les stérols mais ne présente pas de différence significative avec le Soxhlet à l'hexane. Enfin, l'extraction par la méthode de Folch arrive en dernière position mais n'est pas significativement différente de l'extraction au MeTHF.

Tableau 17 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles d'anis vert

Méthode d'extraction	Teneur totale en stérols (mg/ g huile)
Soxhlet à l'hexane	3,427 ± 0,363
Folch	2,439 ± 0,274
CO ₂ supercritique	3,859 ± 0,670
Soxhlet au Me-THF	2,902 ± 0,257

Dans la figure 27 sont présentées les teneurs en chaque stérol identifié dans les huiles sous la forme des moyennes et écarts-type. Pour les valeurs détaillées, un tableau est présenté dans l'annexe 16.

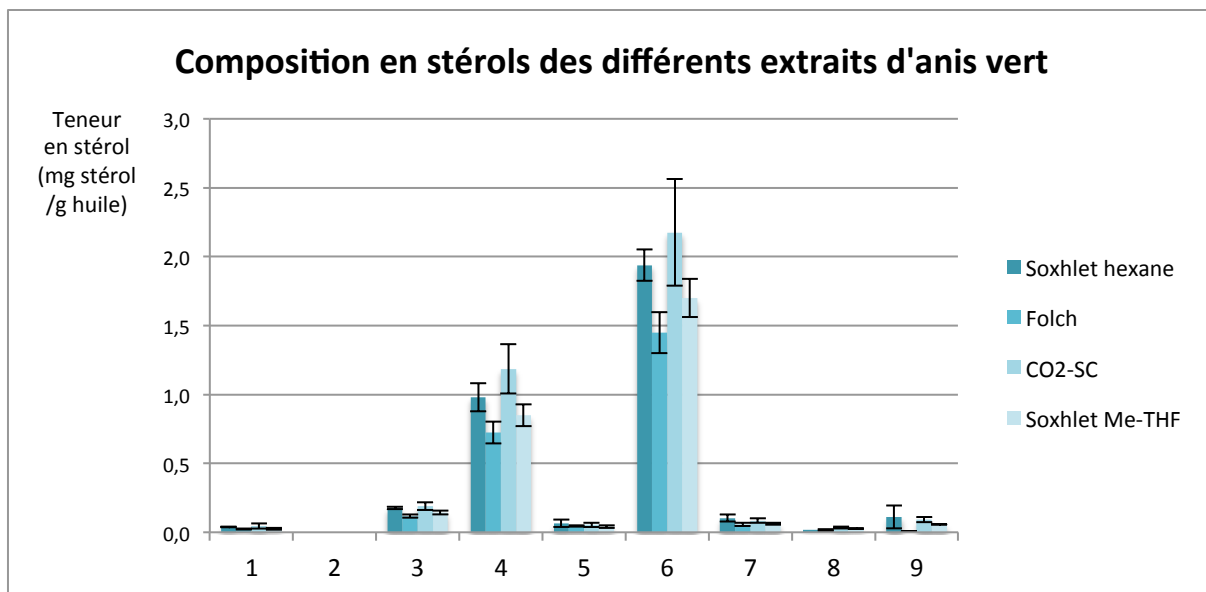


Figure 27 : Composition en stérols des extraits d’anis vert : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol et (9) Δ^7 -avenastérol

Le β -sitostérol représente la moitié ou plus de la totalité des stérols (56 à 60 % en fonction de la méthode d’extraction) avec une teneur allant jusque $2,175 \pm 0,386$ mg/g huile pour les extraits obtenus au CO₂ supercritique. Vient ensuite le stigmastérol (28 à 31 % des stérols totaux) avec une teneur de $1,184 \pm 0,179$ mg/g huile extraite au CO₂-SC. Le campestérol représente 5 % de la totalité des stérols avec $0,190 \pm 0,030$ mg/g huile de ce même extrait. Les stérols Δ^7 -avenastérol, sitostanol, Δ^7 -campestérol, cholestérol et Δ^5 -avenastérol sont également présents en plus faibles quantités. Le même ordre d’abondance des stérols est observé peu importe la méthode d’extraction, bien que celles-ci extraient plus ou moins les stérols.

Carvi

Un chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés d’une huile de carvi obtenue par extraction au CO₂ supercritique est présenté dans la figure 28. Les chromatogrammes des huiles de carvi obtenues par d’autres méthodes, à l’allure similaire, sont présentés dans l’annexe 14.

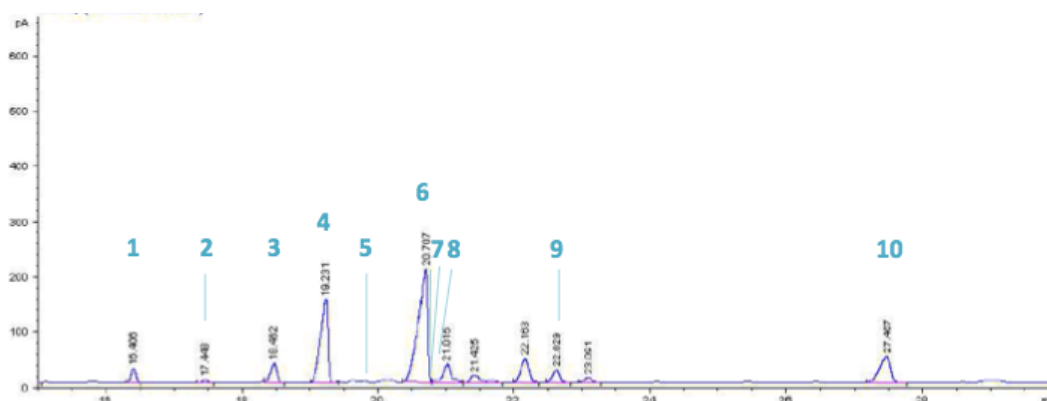


Figure 28 : Chromatogramme de séparation des stérols triméthylsilylés d’un extrait de carvi au CO₂-SC

Les pics identifiés correspondent au (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol, (9) Δ^7 -avenastérol et (10) bétuline, SI.

Ce chromatogramme indique que le β -sitostérol est le stérol majoritaire, suivi du stigmastérol. Le campestérol et le cholestérol sont également présents dans les huiles de carvi, ainsi le Δ^7 -campestérol, le Δ^7 -avenastérol, le Δ^5 -avenastérol, le sitostanol et le cholest-7-en-3 β -ol. Ce stérol, qui ne semble pas présent dans les huiles de fenouil ni d'anis, a été identifié dans celles de carvi. Cette molécule est semblable à celle du cholestérol, mais différent par la position de la double liaison qui se situe au niveau du carbone 7 au lieu du carbone 5. (Figure 29)

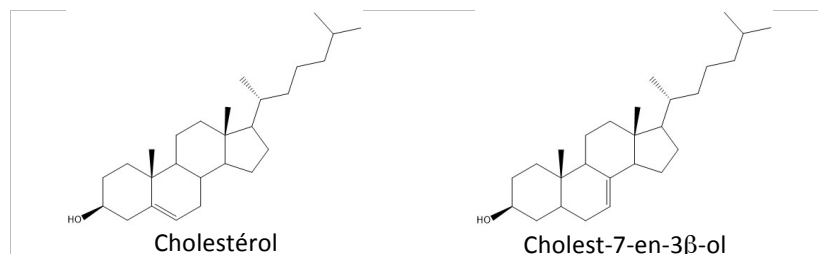


Figure 29 : Structure du cholestérol et du cholest-7-en-3 β -ol

Une fois de plus, les huiles extraites au CO₂ supercritique sont les plus riches en stérols. (Tableau 18) Elles contiennent significativement plus de stérols que les huiles extraites au Soxhlet à l'hexane, elles même significativement plus riches en stérols que celles obtenues au Soxhlet au MeTHF. Enfin, les huiles issues de la méthode de Folch sont significativement plus pauvres en stérols que toutes les autres.

Tableau 18 : Teneurs totales en stérols des différentes huiles de carvi

Méthode d'extraction	Teneur totale en stérols (mg/ g huile)
Soxhlet à l'hexane	6,453 \pm 0,267
Folch	4,527 \pm 0,198
CO ₂ supercritique	7,256 \pm 0,468
Soxhlet au Me-THF	5,377 \pm 0,387

La Figure 30 reprend les moyennes et écarts types des quantités de stérols retrouvées dans les différentes huiles de carvi et un tableau avec les valeurs exactes est annexé. (Annexe 17)

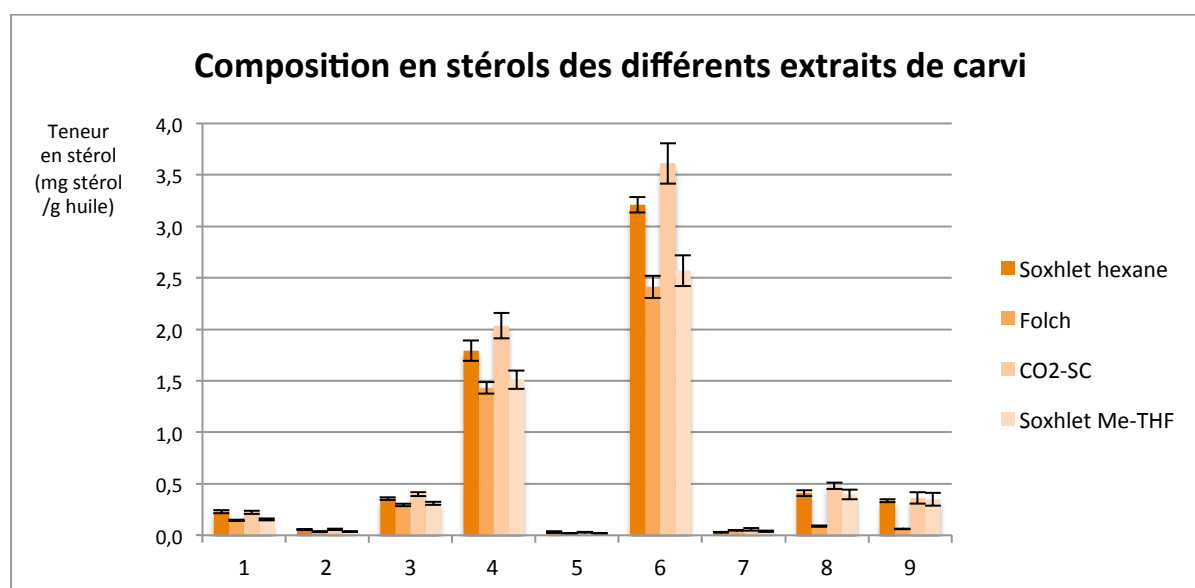


Figure 30 : Composition en stérols des extraits de carvi : (1) cholestérol, (2) cholest-7-en-3 β -ol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol et (9) Δ^7 -avenastérol

Le stérol majoritaire dans les huiles de carvi est le β -sitostérol. Il représente environ la moitié de la composition totale en stérols. Dans un gramme d'huile obtenue au CO₂ supercritique sont contenus $3,611 \pm 0,198$ mg de β -sitostérol. Ensuite, le stigmastérol est également présent en relativement grandes quantités, avec $2,036 \pm 0,123$ mg/g huile extraite au CO₂-SC, représentant 28 à 32 % des stérols totaux dans cette huile. Le campestérol représente plus ou moins 5 % des stérols totaux. Le Δ^7 -avenastérol et le Δ^5 -avenastérol sont également présents dans des quantités similaires, sauf dans l'huile obtenue par Folch. Le cholestérol compte pour 3 %. Enfin le cholest-7-en-3 β -ol et le sitostanol sont présents en plus faibles quantités, comptant chacun pour moins de 1 % de la teneur totale en stérols. Ces proportions sont observées dans toutes les huiles, peu importe la méthode d'extraction à partir de laquelle elles ont été obtenues.

Comparaison des plantes

Les teneurs totales en stérols sont indubitablement plus élevées dans les huiles de carvi que dans celles de fenouil et d'anis. La différence est même très hautement significative. Les huiles d'anis sont les moins riches en stérols. Pour toutes les extractions, elles sont significativement plus pauvres en stérols que les huiles de fenouil, sauf pour celle au CO₂ supercritique.

Les deux stérols majoritaires dans tous les types de graines sont le β -sitostérol et le stigmastérol. Ils représentent ensemble toujours 80 à 90 % de la composition totale en stérols. Alors que les huiles de fenouil contiennent plus de stigmastérol, celles d'anis et de carvi contiennent majoritairement du β -sitostérol. Le carvi renferme significativement plus de β -sitostérol que l'anis, et le fenouil significativement encore moins, peu importe la méthode d'extraction. Le stigmastérol est plus présent dans le fenouil. Cependant, les huiles de carvi n'en contiennent significativement moins que dans le cas des méthodes conventionnelles. La teneur en stigmastérol est toujours significativement la plus faible dans les huiles d'anis vert.

Le campestérol, présent en concentrations moins importantes, est toujours le troisième stérol le plus abondant. Les huiles de carvi et de fenouil en contiennent significativement plus que les huiles d'anis.

Les autres stérols sont présents en plus faibles quantités. Les teneurs en cholestérol sont significativement plus importantes dans les huiles de carvi, et le cholest-7-en-3 β -ol n'est retrouvé que dans ces dernières. Le Δ^7 -campestérol y est par contre moins abondant que dans les autres huiles. Ce stérol est significativement plus présent dans les huiles de fenouil. Le Δ^5 -avenastérol et le Δ^7 -avenastérol sont principalement retrouvés dans l'huile de carvi, où ils sont présents en concentrations significativement plus élevées que dans les huiles de fenouil et d'anis. Enfin, les teneurs en sitostanol sont significativement plus élevées dans les huiles d'anis que dans celles des autres graines.

Comparaison des méthodes d'extraction

Il est certain que toutes les méthodes d'extraction ne sont pas égales au niveau de la teneur en stérols des huiles qu'elles délivrent. Deux méthodes sortent du lot. Comme déjà constaté précédemment, l'extraction au CO₂ supercritique donne les huiles les plus riches en stérols. Cependant, les huiles obtenues par Soxhlet à l'hexane sont également riches en stérols et ne sont pas toujours significativement plus pauvres que celles obtenues au CO₂-SC. Les huiles obtenues par Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane par contre sont plus pauvres en stérols, et celles obtenues par Folch encore plus. En considérant chaque stérol individuellement, les constatations sont identiques, les huiles obtenues par CO₂ supercritique et à l'hexane sont toujours plus fournies en stérols.

Les proportions entre les différents stérols des huiles obtenues par différentes méthodes d'extraction sont semblables. Un type d'extraction ne semble donc pas favoriser l'extraction d'un stérol plutôt qu'un autre. (Figure 31)

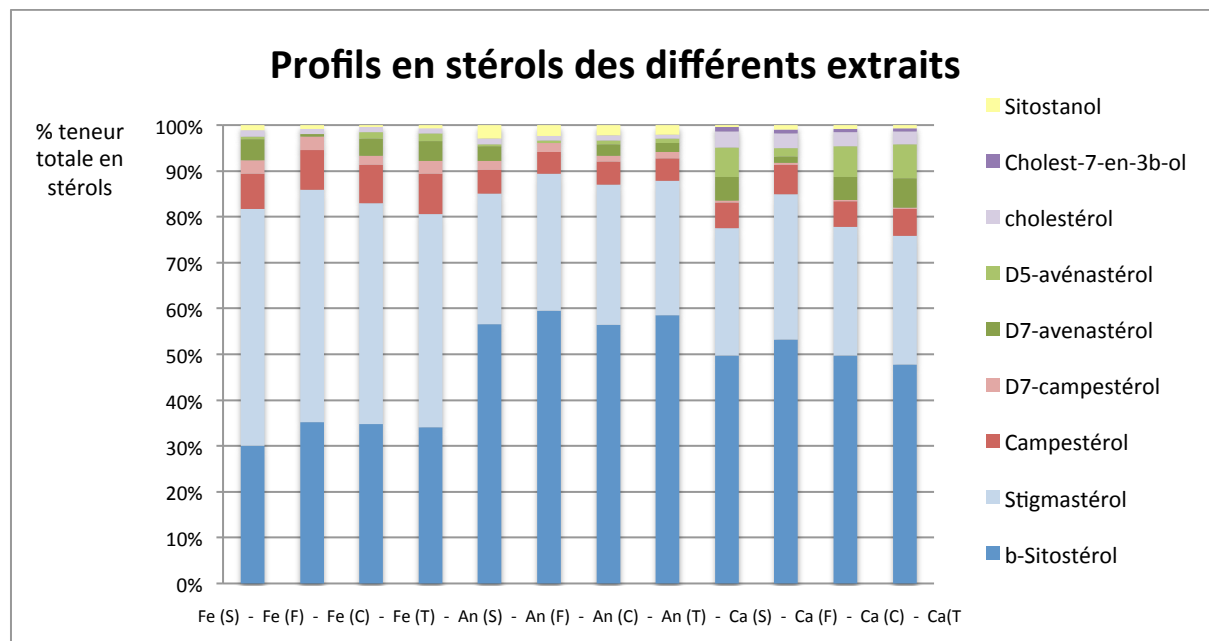


Figure 31 : Profils en stérols des différents extraits lipidiques des graines de fenouil, anis vert et carvi

Fe : fenouil, An : anis vert, Ca : carvi, et (S) : Soxhlet à l'hexane, (F) : Folch, (C) : CO₂-SC et (T) : Soxhlet au MeTHF

Teneurs et profils en composés phénoliques

Teneur totale en composés phénoliques par Folin-Ciocalteu

La teneur en composés phénoliques totaux des huiles devait initialement être mesurée par technique spectrophotométrique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Cependant, l'ajout des réactifs en solutions aqueuses provoquant une émulsion, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats corrects et exploitables. (cfr. *Matériels et méthodes p. 40*). Aucune conclusion n'a donc pu être tirée de ce test d'un point de vue quantitatif. Cependant, il était clairement visible à l'œil nu que le milieu réactionnel contenant l'extrait d'anis était le plus foncé, suivi de celui de carvi et enfin celui de fenouil. Cela est très approximatif mais concorde toutefois avec les valeurs trouvées dans la littérature. En effet, (Pandey et al., 2012) attribuent une plus forte teneur totale en composés phénoliques aux graines de carvi qu'à celles de fenouil avec des valeurs de $35,445 \pm 1,84$ mg d'équivalent en acide gallique par g de graines de carvi et $21,712 \pm 3,60$ mg EAG/g graines de fenouil. (Souri et al., 2008) rapportent une teneur en composés phénoliques de $353,92 \pm 1,64$ mg/100 g de graines d'anis et $165,07 \pm 11,43$ mg/100 g de graines de fenouil. Il semblerait donc que les graines d'anis contiennent plus de composés phénoliques que celles de carvi, qui elles-mêmes en contiennent plus que celles de fenouil.

Profil en composés phénoliques par HPLC

Les composés phénoliques d'un extrait peuvent être séparés, identifiés et quantifiés par HPLC-DAD selon les étapes expliquées dans la partie matériel et méthode. Cependant, par manque de temps, il n'a pas été possible d'analyser toutes les huiles. La méthode a toutefois été testée sur l'une d'entre elles. Le choix s'est porté sur celle présentant l'activité antioxydante la plus élevée : l'huile de carvi obtenue par Soxhlet au 2-méthyltetrahydrofurane. (cfr. Résultats : Activité antioxydante p.65)

Un premier extrait méthanolique d'une huile de carvi (celle obtenue par Soxhlet à l'hexane) a été injecté en HPLC-DAD. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 32.

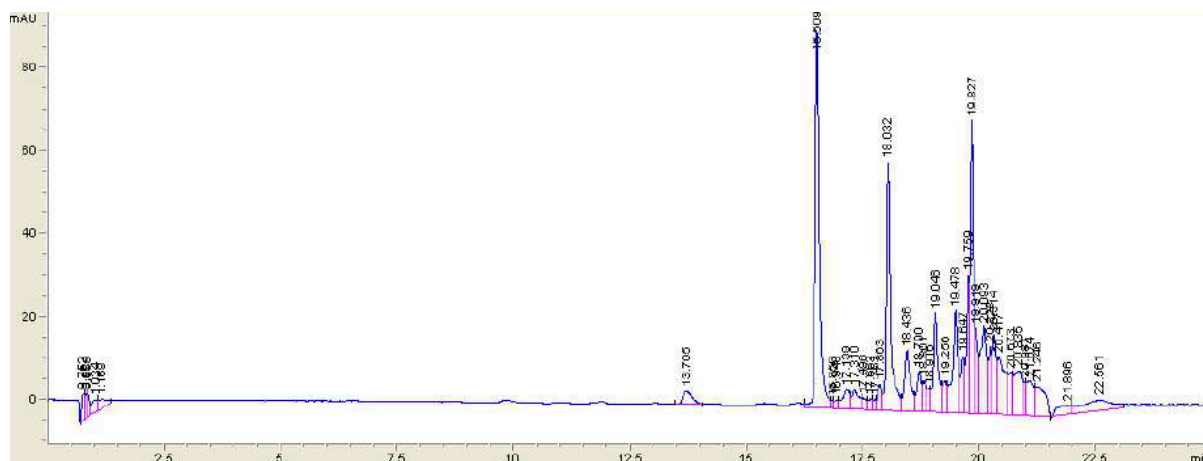


Figure 32 : Chromatogramme de séparation des composés phénoliques d'un extrait d'huile de carvi obtenue par Soxhlet à l'hexane

Un mix de standards a ensuite été injecté dans le but d'identifier quelques composés phénoliques. La figure 33 représente le chromatogramme de séparation des composés témoins. Ceux-ci ont pu être identifiés sur base de leurs temps de rétention car ils ont préalablement été injectés seuls.

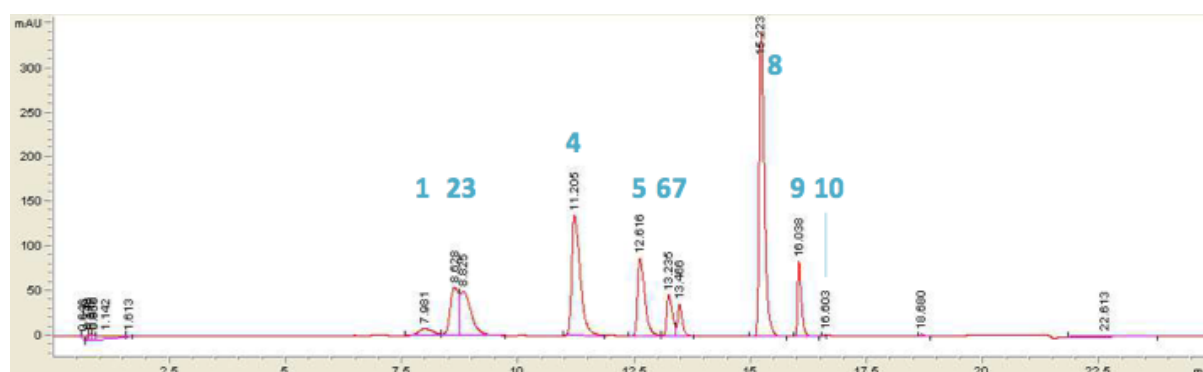
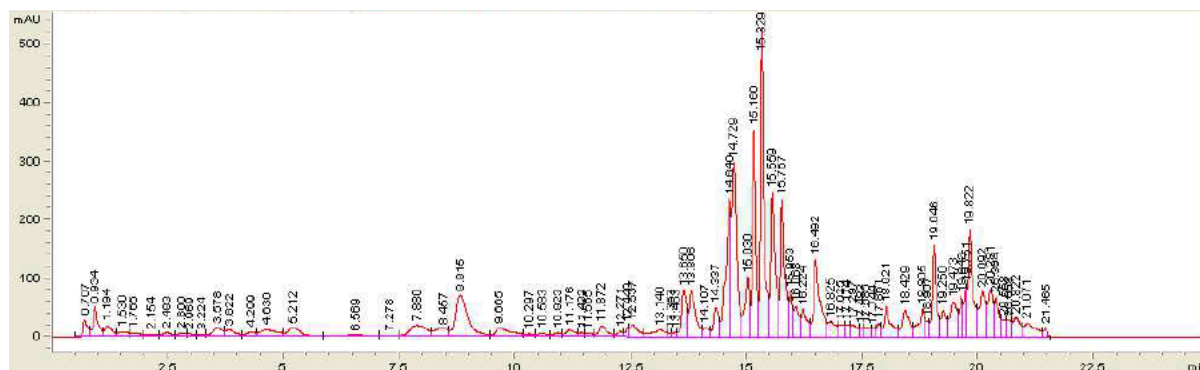


Figure 33 : Chromatogramme de séparation des composés phénoliques du mix de standards à 0,05 mg/mL, détection à 280 nm.

Les pics correspondent aux composés suivants : (1) catéchine, (2) acide caféique, (3) acide chlorogénique, (4) acide *p*-coumarique, (5) acide férulique, (6) acide sinapique, (7) rutine, (8) acide cinnamique, (9) quercétine, (10) lutéoline¹²

¹² La concentration en lutéoline est inconnue. Le récipient étant presque vide, la quantité restant dedans n'a pu être pesée et a simplement été récupérée par suspension dans le méthanol.

Par comparaison de ces deux chromatogrammes, le choix du standard interne s'est arrêté sur l'acide cinnamique. Ce composé ne semble pas être présent dans l'extrait d'huile de carvi et présente une réponse élevée au détecteur DAD. Une nouvelle extraction méthanolique de l'huile a alors été effectuée en ajoutant 100 µL d'une solution d'acide cinnamique à 1 mg/mL à la prise d'essai. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 34.



Les activités de toutes les huiles (aux dilutions testées) sont inférieures à celle de la solution de trolox. La solution de trolox utilisée comme référence contient la molécule de trolox uniquement, alors que les huiles sont des extraits bruts, des mélanges complexes de molécules. De plus, le trolox a été testé à une concentration 10^{-3} M et les extraits ont été dilués 10^2 fois en terme volumique. Il est dès lors compliqué de comparer les extraits à la référence directement. Néanmoins, les extraits peuvent être comparés entre eux.

Comparaison des plantes

De manière générale, les huiles d'anis et de carvi possèdent de meilleures activités antiradicalaires que les huiles de fenouil. En effet, les activités antioxydantes des différents extraits de fenouil ne dépassent jamais 70 % par rapport à la référence, alors que certains extraits d'anis et de carvi peuvent atteindre des activités de 90 %. Pour ce qui est de l'anis et du carvi, il est difficile de déterminer si les différences sont significatives ou non car les conditions d'applications d'analyse de la variance ne sont pas respectées.

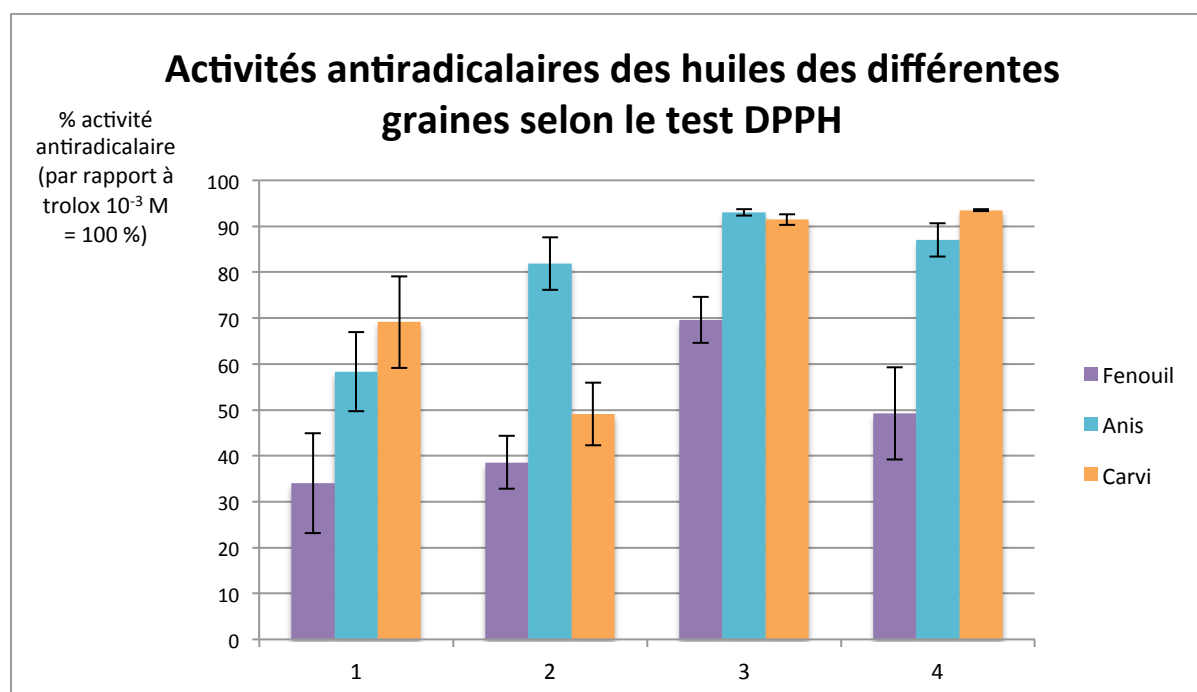


Figure 35 : Activités antiradicalaires des différentes graines par type d'extraction (1) Soxhlet hexane, (2) Folch, (3) CO₂ supercritique et (4) Soxhlet 2-méthyltétrahydrofurane

Ces résultats peuvent être appuyés par les teneurs en composés phénoliques des huiles car ces molécules sont reconnues comme possédant des propriétés antioxydantes. Malheureusement, il n'a pas été possible de déterminer les teneurs totales en phénols des huiles (*cfr. p.62*). Cependant, les données trouvées dans la littérature permettent d'expliquer les différences d'activités antioxydantes entre le fenouil, l'anis et le carvi. Comme déjà exposé précédemment, la littérature reconnaît une teneur en composés phénoliques plus élevée à l'anis vert, puis au carvi et enfin au fenouil. (Souri et al., 2008; Pandey et al., 2012) Malgré l'absence de caractérisation des huiles testées en termes de composition phénolique, les résultats obtenus semblent cohérents avec les teneurs phénoliques trouvées dans la littérature.

Ces différences sont très faibles et ne peuvent pas toujours être confirmées de manière statistique, mais lorsque les huiles sont obtenues par des méthodes d'extraction à froid, l'anis présente un meilleur pouvoir antioxydant que le carvi, alors que pour les huiles obtenues par extractions à chaud, les résultats des huiles d'anis sont moins convaincants que ceux de carvi. Cela pourrait être dû à la présence de molécules à pouvoir antioxydant plus thermosensibles dans les graines d'anis que dans celles de carvi. Les traitements à la chaleur pourraient dégrader ces molécules et donc diminuer le pouvoir antioxydant des extraits d'anis.

Comparaison des méthodes d'extraction

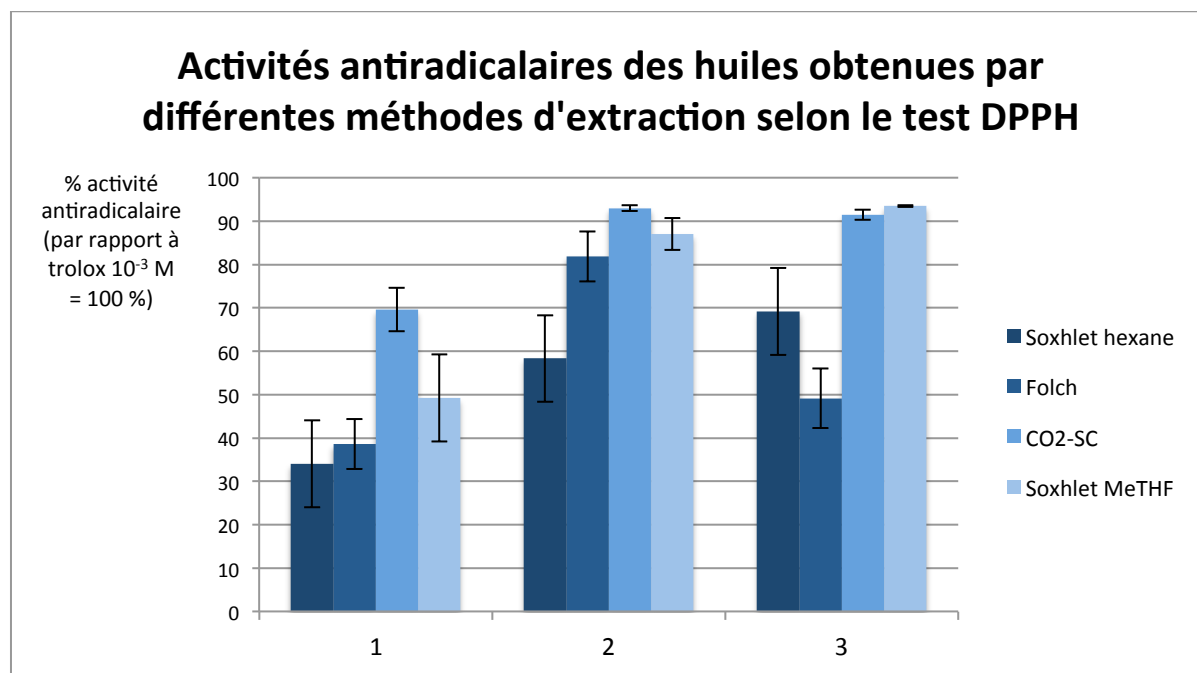


Figure 36 : Activités antiradicalaires des extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction par type de graines (1) fenouil, (2) anis vert et (3) carvi

Pour chacune des graines, les méthodes alternatives donnent des huiles à pouvoirs antioxydants plus élevés (la significativité de la différence n'a pu être confirmée que dans le cas du fenouil, les conditions d'application du test statistique n'étant pas vérifiées dans le cas de l'anis et du carvi). Le CO₂ supercritique semble être la meilleure méthode d'extraction pour obtenir des huiles à hauts potentiels antioxydants. L'activité antioxydante d'un extrait peut être corrélée avec sa teneur en phénols. Cela est en accord avec les travaux de (Zekovic et al., 2016) qui montrent que les extraits lipidiques de graines de coriandre obtenus au CO₂-SC sont enrichis en polyphénols. Pour expliquer cela, plusieurs hypothèses peuvent être émises : les méthodes alternatives pourraient être plus efficaces pour extraire les composés phénoliques, être moins destructrices pour ces molécules, ou encore favoriser l'extraction d'autres molécules également pourvues d'un pouvoir antioxydant.

L'extraction par Soxhlet à l'hexane est la méthode la plus conventionnelle pour extraire les lipides. C'est également celle qui donne les huiles présentant généralement les propriétés antioxydantes les plus faibles. L'hypothèse de la dégradation thermique de molécules antioxydantes n'est que peu pertinente étant donné que l'extraction par Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane, méthode d'extraction à chaud également, donne des huiles à pouvoirs antioxydants largement supérieurs. Le facteur déterminant serait dès lors le solvant, sans doute plus précisément sa polarité. Il est toujours possible que des molécules à pouvoir antioxydant se trouvent dégradées par la chaleur, mais si tel est le cas, cette perte serait compensée par d'autres molécules. Le MeTHF aurait dès lors une meilleure affinité pour les phénols ou d'autres molécules à propriétés antioxydantes que l'hexane.

La méthode de Folch, bien qu'étant une méthode d'extraction à froid, ne donne pas des huiles à fortes activités antioxydantes. Dans le cas du fenouil, l'activité antioxydante de l'huile obtenue par la méthode de Folch est aussi faible que celle de l'huile obtenue par Soxhlet à l'hexane. Dans le cas de l'anis, l'activité de l'huile obtenue par Folch est plus élevée que celle par Soxhlet à l'hexane. Enfin, dans le cas du carvi, elle présente une activité encore plus faible que celle obtenue par Soxhlet à l'hexane.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les huiles de graines de la famille botanique des Apiacées contiennent de nombreux composés d'intérêts. Un certain nombre d'entre eux a été étudié dans ce travail visant à comparer différentes méthodes d'extraction des fractions lipidiques de ces graines. Le solvant actuellement utilisé pour extraire les lipides est le n-hexane, mais celui-ci pose divers problèmes, aussi bien au niveau environnemental et sécuritaire qu'au niveau de la santé publique. C'est pourquoi des alternatives sont recherchées afin d'éviter l'utilisation de solvants d'origine pétrolière. (Abert Vian et al., 2013) C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail lors duquel des huiles ont été extraites par deux méthodes conventionnelles puis par deux méthodes alternatives plus vertes. Ces huiles ont été caractérisées en termes de compositions en acides gras et en stérols. Leurs activités antioxydantes ont également été déterminées. Chacun de ces résultats est abordé dans cette discussion générale de façon orientée sur les différentes applications qu'une huile issue de graines d'Apiacées pourrait avoir. En effet, le choix de l'une ou l'autre graine et méthode d'extraction dépendra de l'application destinée à l'huile et de ce qui est recherché dans celle-ci.

1. Rendements massiques d'extraction

Pour commencer, les graines contenant les plus hautes teneurs en lipides sont celles d'anis vert. En termes de rendement massique, les méthodes d'extraction les plus rentables sont celles de Folch et de Soxhlet à l'agro-solvant 2-méthyltétrahydrofurane. Ces résultats sont positifs et constituent un argument au remplacement de l'hexane par l'agro-solvant, qui permet d'obtenir des quantités d'huile supérieures. L'extraction au CO₂ supercritique ne donne pas des quantités d'huiles aussi élevées que les autres méthodes. Néanmoins, en optimisant la méthode et en extrayant sur des plus longues durées, il serait certainement possible de rattraper l'écart.

2. Acides gras

Les huiles les plus riches en acides gras sont celles de carvi, suivies de celles de fenouil puis celles d'anis. En terme d'extraction, celles obtenues à l'aide de 2-méthyltétrahydrofurane sont les plus riches, suivie de l'autre méthode d'extraction alternative, au CO₂ supercritique. Néanmoins, d'un point de vue statistique, ces différences ne sont, dans la majorité des cas, pas significatives.

Les acides gras saturés laurique, myristique et palmitique engendrent une augmentation du cholestérol total et LDL dans le plasma. Quant à l'acide stéarique, c'est l'acide gras saturé le moins hypercholestérolémiant. (Williams, 2000; Lecerf, 2007) Si l'acide linoléique représente plus de 5 à 6 % de l'apport énergétique total, ce dernier annule l'effet hypercholestérolémiant de l'acide palmitique. (Lecerf, 2007) L'acide myristique est présent dans toutes les huiles en proportions infimes. Quant à l'acide palmitique, les graines en contenant le moins sont celles d'anis. Les méthodes d'extraction alternatives donnent des huiles plus riches en C16:0. Cependant, d'un point de vue relatif, les proportions en C16:0 sont les plus élevées dans les huiles obtenues à l'hexane et les plus faibles dans celles obtenues au 2-méthyltétrahydrofurane. Cependant, l'acide linoléique étant toujours présent en proportions beaucoup plus importantes que l'acide palmitique, ce critère n'est pas discriminant pour une huile plutôt qu'une autre.

La famille botanique étudiée étant les Apiacées, la teneur en acide pétrosélinique constitue un critère de comparaison majeur. En effet, celui-ci a une importance industrielle car il est utilisé pour la fabrication de polymères et de détergents (Murphy, 1996), mais il est également bénéfique dans l'alimentation. (Weber et al., 1997) lui ont attribué un rôle d'inhibition des réactions d'élongation de chaîne de l'acide linoléique, ce qui mène à une diminution du taux d'acide arachidonique dans le foie. De plus, l'acide pétrosélinique a aussi un intérêt pharmaceutique, (Alaluf et al., 2002) lui ont reconnu un effet anti-inflammatoire. Pour obtenir une huile riche en acide pétrosélinique, la graine à privilégier est le fenouil car c'est celle qui présente l'huile en contenant le plus, autant en termes de proportion que de teneur absolue. Au niveau des extractions, les méthodes d'extraction alternatives donnent des huiles à plus hautes teneurs en C18:1, en particulier le Soxhlet au MeTHF.

L'acide linoléique (C18:2 n-6) est un acide gras essentiel pour l'homme. Il est nécessaire pour une croissance normale et le bon déroulement des fonctions physiologiques des tissus. De plus, l'homme et l'animal sont incapables de le synthétiser. Il doit donc être apporté par l'alimentation. (Legrand, 2007) Cela confère aux acides gras C18:2 un intérêt certain en agroalimentaire. Dans ce cas, les graines de carvi sont sans doute plus intéressantes car elles contiennent proportionnellement plus de C18:2. Au niveau des méthodes d'extraction, les deux méthodes d'extraction alternatives donnent des huiles légèrement enrichies en ce type d'acides gras.

Le degré d'insaturation d'une huile peut également être un critère de sélection d'une graine ou d'une méthode d'extraction. Comme expliqué précédemment, la consommation d'acides gras insaturés est préférable, leur conférant un intérêt en agroalimentaire. Néanmoins, d'un point de vue stabilité de l'huile, il est préférable de limiter le degré d'insaturation car les acides gras insaturés sont davantage sensibles à l'oxydation. En ce qui concerne le choix d'une graine sur base de ce critère, l'anis est celle qui présente le rapport insaturé/saturé le plus élevé, suivi du fenouil, puis du carvi. Au niveau des méthodes d'extraction le Soxhlet au 2-méthyl-tétrahydrofurane est celle donnant les huiles aux rapports d'insaturation les plus élevés pour chaque type de graine, et la méthode de Folch les plus faibles.

3. Stérols

Les phytostérols ont des rôles importants dans divers domaines. Ils sont utilisés en pharmaceutique pour la production de stéroïdes thérapeutiques. Dans les industries cosmétiques et agroalimentaires, ils sont ajoutés aux produits pour leurs bienfaits sur la santé. Les stérols végétaux sont principalement connus pour avoir un effet réducteur du cholestérol LDL dans le plasma et de cette façon diminuer le risque de maladies cardiovasculaires. Ils présentent également une activité anticancéreuse. (Uddin et al., 2014) Pour une huile riche en stérols, la graine de carvi est de loin le choix le plus judicieux car elle en contient une teneur totale plus élevée. En terme d'extraction, le CO₂ supercritique est la meilleure méthode car c'est celle qui offre les meilleurs recouvrements en stérols. L'extraction par Soxhlet à l'hexane permet également l'obtention d'huiles riches en stérols.

Des activités plus spécifiques sont attribuées à certains stérols en particulier. Par exemple, le Δ^5 -avenastérol aurait une activité antioxydante supérieure aux autres stérols. (Uddin et al., 2014) Ce composé confère donc une meilleure stabilité à l'huile. Cependant, ce composé n'est présent qu'en infimes quantités dans toutes les huiles extraites lors de ce travail.

Les travaux de (Burg et al., 2013) ont montré que le stigmastérol pourrait être un composant alimentaire intéressant dans la maladie d'Alzheimer. En effet, les phytostérols, et plus particulièrement le stigmastérol, sont moins amyloïdogéniques que le cholestérol. Cela signifie que le stigmastérol joue un rôle ayant pour conséquence la diminution la transformation amyloïdogénique de l'APP (amyloid precursor protein) menant à la formation des fragments peptidiques formant les agrégats toxiques. Dans ce contexte, le stigmastérol peut être recherché dans l'huile. Les graines de fenouil seront alors privilégiées car ce sont celles dont les huiles en contiennent le plus. Celles de carvi en contiennent également beaucoup, d'ailleurs la différence n'est pas significative pour toutes les extractions. Afin d'optimiser le recouvrement en stigmastérol, l'extraction par CO₂ supercritique est la meilleure option, suivie du Soxhlet conventionnel à l'hexane.

4. Activité antioxydante

Une bonne activité antioxydante est une propriété très recherchée dans de nombreux domaines, en agroalimentaire ou en pharmaceutique par exemple. Comme expliqué dans la bibliographie, un déséquilibre de la balance naturelle prooxydant/antioxydant dans le corps peut provoquer divers types de dégâts cellulaires et causer différentes maladies. En agroalimentaire, les antioxydants permettent de limiter la dégradation des aliments due à l'oxydation de divers composés. Les graines délivrant les huiles les plus antioxydantes sont celles d'anis et de carvi. Au niveau de la méthode d'extraction, il est possible de rendre optimale l'activité antioxydante de l'huile d'une graine en l'extrayant au CO₂ supercritique ou par Soxhlet au 2-méthyl-tétrahydrofurane.

5. Autres critères

Outre les caractéristiques des huiles précédemment décrites, qui sont fonction autant des graines que des méthodes d'extraction, d'autres critères doivent également être pris en compte dans le choix de l'une ou l'autre méthode d'extraction.

Si des alternatives aux méthodes conventionnelles sont recherchées, c'est parce que les solvants actuellement utilisés posent problème. En effet, ceux-ci ont des effets néfastes, principalement au niveau environnemental. En effet, les solvants conventionnels sont issus de sources pétrolières, qui s'épuisent chaque jour de plus en plus. D'un point de vue écologique, les méthodes alternatives seront donc privilégiées. En effet, les agro-solvants sont issus de ressources renouvelables. Le Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane est plus respectueux de l'environnement que celui à l'hexane. L'extraction au CO₂ supercritique permet de réduire davantage l'impact environnemental du procédé d'extraction. C'est la méthode dont le solvant est le moins néfaste.

Un autre problème posé par les méthodes conventionnelles se situe au niveau de la santé publique et de la sécurité. En effet, l'hexane est toxique et inflammable. De plus, des traces de solvant peuvent subsister dans le produit fini. Dans cette optique, c'est encore l'extraction au CO₂ supercritique qui est la meilleure option car le CO₂ n'est ni toxique ni inflammable. Cette technique assure même un produit final exempt de quelconque résidu de solvant.

Evidemment, l'aspect économique est également un argument pesant de façon considérable dans un choix. D'après ("Product Specification Sigma-Aldrich," August-10-2017), les solvants se situent tous dans la même gamme de prix, mis à part le chloroforme qui est moins cher. Cependant, pour l'extraction par la méthode de Folch, du méthanol est également nécessaire, ainsi que de la main d'œuvre. En effet, cette méthode est plus complexe, elle se déroule en différentes étapes et requiert plus d'interventions. Dans le cas de l'extraction au CO₂ supercritique, il faut évidemment prendre en compte l'investissement pour l'appareillage d'extraction mais le prix du solvant, les bonbonnes de CO₂ liquide, est beaucoup moins élevé.

6. Intérêt à grande échelle

Afin de replacer ce travail dans un contexte à plus grande échelle, il est intéressant de se renseigner sur le marché potentiel dans lequel il pourrait s'inscrire. Cependant, il est difficile de trouver des informations exactes concernant les volumes de plantes aromatiques et médicinales impliqués dans les échanges internationaux. Cela est en partie dû au fait que ces plantes sont utilisées par de nombreuses industries différentes et que les compagnies concernées par ce commerce partagent peu d'informations. (Lubbe et al., 2011) Quelques valeurs exposées ci-dessous permettent toutefois de se faire une idée de l'importance du marché de ces trois graines.

Premièrement, 74 000 tonnes de graines de fenouil ont été produites en Inde en 2011. Le rendement de culture peut atteindre 2 à 2,5 tonnes de graines par hectare. Les graines de fenouil sont valorisées de différentes façons. Elles sont principalement produites pour leur huile essentielle, pour en faire de la poudre ou encore pour en extraire l'huile fixe. (Malhotra, 2012a) Ensuite, l'anis est cultivé dans de nombreux pays méditerranéens et en Russie. Un hectare de culture permet de produire entre 0,5 et 1 tonne de graines. Les pays exportateurs sont principalement la Turquie, l'Égypte et l'Espagne. Entre 40 et 50 tonnes d'huile essentielle d'anis vert sont produites chaque année dans le monde. L'anis et son huile essentielle sont très largement utilisés comme agent de goût dans toutes sortes de produits alimentaires (boissons, friandises, produits laitiers, viandes, etc). (Özgüven, 2012) Enfin, chaque année, la production mondiale de graines de carvi se chiffre à environ 15 000 tonnes. Le rendement en graines de la culture de carvi s'élève à 1 à 3 tonnes par hectare pour les espèces biennales et 0,7 à 1 tonne pour les espèces annuelles. Environ 3 500 tonnes de graines de carvi et de produits dérivés sont importées par an aux États Unis, dont 80 % proviennent des Pays-Bas, le plus grand exportateur mondial. La production annuelle d'huile essentielle de carvi tourne autour de 30 à 40 tonnes, ce qui représente une valeur de plus d'un million de dollars. (Malhotra, 2012b)

Les résultats obtenus lors de ce travail peuvent non seulement servir dans le cadre de la simple extraction d'huile de ces graines, dont le commerce a déjà une importance mondiale, mais il est possible d'aller plus loin dans la valorisation des graines. (Figure 37) Actuellement, les graines de fenouil, d'anis vert et de carvi sont principalement valorisées comme épices, sous forme broyée, ou pour en extraire les huiles essentielles. Étant donné qu'une partie importante des graines de ces trois plantes cultivées est utilisée pour en soutirer l'huile essentielle, il serait intéressant de valoriser le résidu de distillation obtenu après extraction de l'huile essentielle. Cette opération d'extraction ne soutirant que les composés volatils, le résidu de distillation, « résidu 1 », contient encore de nombreux composés intéressants, dont ceux étudiés lors de ce travail. La chaleur ne semble pas dégrader ces composés d'intérêt ni altérer l'activité antioxydante car les résultats obtenus pour les huiles extraites à chaud au 2-méthyl-tétrahydrofurane sont intéressants. De plus, (Navarrete et al., 2011) ont obtenu de bons résultats d'activités antioxydantes sur des résidus solides d'extraction de l'huile essentielle de romarin lors de travaux visant à valoriser ce déchet agricole. Par la suite, étant donné que selon la littérature, les graines de fenouil d'anis et de carvi sont composées de presque de moitié de glucides, contiennent 10 à 20 % de protéines et sont également riches en fibres et minéraux, le

tourteau obtenu après cette seconde étape, « résidu 2 », pourrait être valorisé à son tour. Il pourrait être épandu sur des cultures et faire office de fertilisant, servir comme alimentation pour bétail ou encore être transformé en biogaz afin de produire de l'électricité

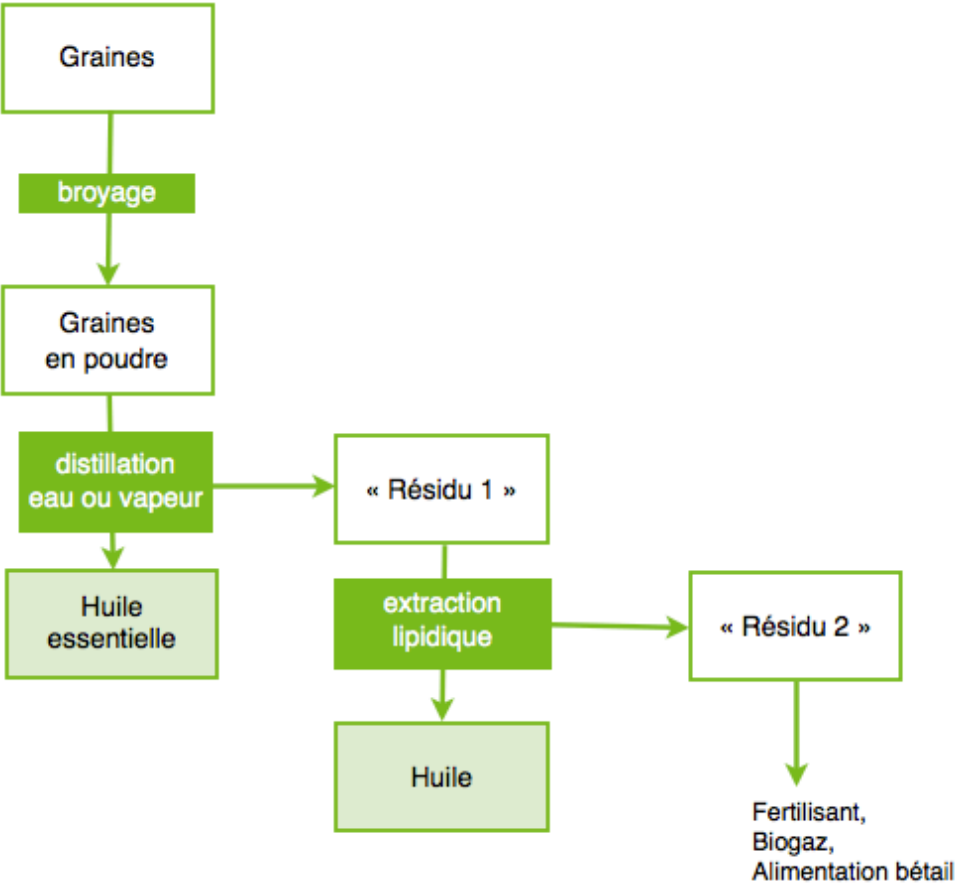


Figure 37 : Procédé de valorisation des graines

PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, différents points restent incomplets ou pourraient être améliorés.

Premièrement, au niveau des extractions, il serait intéressant de comparer ces méthodes d'extraction chimiques avec une méthode d'extraction physique comme le pressage. L'extraction au CO₂ supercritique pourrait également être optimisée plus en profondeur. Il est probable qu'en extrayant simplement durant de plus longues durées, les rendements massiques en huiles soient plus élevés.

Ensuite, l'absence de résultats concernant le dosage des composés phénoliques totaux constitue une lacune du travail. Le problème rencontré lors du test de Folin-Ciocalteu n'a pas pu être résolu, mais cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas de solution. De plus, il serait intéressant de poursuivre l'identification et la quantification des composés phénoliques par HPLC suivant la méthode expliquée dans la partie « matériel et méthode » et testée pour une huile. Il serait d'autant plus intéressant de pouvoir se baser sur plus de témoins ou effectuer une étape de déglycosylation des composés phénoliques présents dans les huiles afin de pouvoir identifier un maximum de composés.

D'autres composés et caractéristiques valent également la peine d'être investigués, comme les tocophérols, les phospholipides ou encore l'activité anti-inflammatoire. En effet, en tenant compte des concentrations observées en acides gras et en stérols, 70 à 90 % (en terme massique) de la composition chimique des huiles seulement est élucidée. Ensuite, l'acide pétrosélinique possédant une activité anti-inflammatoire, une tentative de test spectrophotométrique basé sur une mesure d'inhibition de l'enzyme lipoxygénase, impliquée dans la réaction inflammatoire, a été effectuée, mais sans succès, pour la même raison que le test de Folin-Ciocalteu. Le protocole nécessitait l'ajout de tampon phosphate afin de maintenir le pH du milieu réactionnel au pH physiologique de l'enzyme. L'ajout de ce tampon a immédiatement provoqué la formation d'une émulsion, rendant impossible la mesure d'absorbance du milieu.

Enfin, dans le but de valoriser les déchets agricoles actuellement obtenus suite aux extractions d'huiles essentielles des graines de fenouil, anis vert et carvi, il serait intéressant de tester le procédé de valorisation imaginé précédemment. Pour cela, il faudrait effectuer des extractions d'huiles essentielles sur les poudres de graines et extraire l'huile des résidus de distillation obtenus. Il faudrait ensuite analyser les compositions chimiques et propriétés des produits à chaque étape afin de déterminer si le procédé de valorisation pourrait vraiment être intéressant et mené à grande échelle.

CONCLUSION

D'après les différentes analyses effectuées lors de ce travail, la principale conclusion qui peut en être tirée est qu'il est tout à fait possible de remplacer les méthodes d'extraction conventionnelles par des méthodes alternatives. En effet, l'utilisation de solvants d'origine pétrolière pose divers problèmes auxquels des méthodes d'extraction alternatives peuvent répondre. Ces alternatives constituent donc, en théorie, des solutions convaincantes. En pratique, cela est également le cas, car après analyse des compositions en acides gras et stérols et des pouvoirs antioxydants des huiles obtenues, les méthodes d'extraction alternatives testées délivrent d'aussi bons, voir de meilleurs résultats.

Le Soxhlet à l'agro-solvant 2-méthyltétrahydrofurane est une des deux méthodes qui délivrent les plus hauts rendements en huile, avec la méthode conventionnelle de Folch. De plus, les huiles obtenues au MeTHF présentent de hauts potentiels antioxydants et sont plus riches en acides gras, dont l'acide pétrosélinique qui présente de nombreux intérêts. Quant à l'extraction au CO₂ supercritique, malgré ses rendements massiques d'extraction plus faibles, cette méthode permet d'obtenir les huiles les plus riches en stérols, avec l'extraction conventionnelle à l'hexane, et possédant les pouvoirs antioxydants les plus élevés. Au niveau des teneurs en acides gras, les huiles obtenues au CO₂-SC sont moins riches que celles obtenues au MeTHF mais restent toutefois plus riches que celles obtenues par les méthodes conventionnelles. En ce qui concerne la méthode conventionnelle de Folch, elle a beau fournir de bons rendements massiques, les huiles obtenues ne présentent aucun résultat intéressant, ni en termes de composition en acides gras ou stérols, ni en terme d'activité antioxydante. Le Soxhlet à l'hexane donne des huiles assez riches en stérols, mais cela est le seul résultat qui lui confère de l'intérêt.

Tous ces résultats sont donc encourageants dans l'optique de remplacer les méthodes conventionnelles d'extraction des huiles des graines de fenouil, d'anis vert et de carvi. Il pourrait même être envisagé d'extraire les huiles des résidus de distillation après extraction des huiles essentielles, valorisant de cette manière un déchet issu d'une voie de valorisation déjà développée et importante des graines dont le marché mondial est important.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abert Vian M., Dejoye Tanzi C. & Chemat F., 2013. Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de micro-organismes. *Oilseeds fats Crop. Lipids* **20**(6), 1–6.
- Agrahari P. & Singh D.K., 2014. A review on the pharmacological aspects of *Carum carvi*. *J. Biol. Earth Sci.* **4**(1), M1–M13.
- Alaluf S., Green M.R., Rogers J.S., Watkinson A., Cain F.W., Hu H.L. & Rawlings A.V., 2002. Petroselinic acid and its use in food.
- Avry M.-P. & Gallouin F., 2003. *Epices, aromates et condiments*, Belin, Paris.
- Badgujar S.B., Patel V. V. & Bandivdekar A.H., 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Biomed Res. Int.* **2014**.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 446–475.
- Balasundram N., Sundram K. & Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203.
- Breil C., Meullemiestre A., Vian M. & Chemat F., 2016. Bio-Based Solvents for Green Extraction of Lipids from Oleaginous Yeast Biomass for Sustainable Aviation Biofuel. *Molecules* **21**, 1–14.
- Buchanan B.B., Grisse W. & Jones R.L. (Eds.), 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Budisa N. & Schulze-Makuch D., 2014. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment. *Life* **4**, 331–340.
- Burg V.K., Grimm H.S., Rothhaar T.L., Gro S., Hundsdorfer B., Haupenthal V.J., Zimmer V.C., Mett J., Weinga O., Laufs U., Broersen L.M., Tanila H., Vanmierlo T., Lu D., Hartmann T. & Grimm M.O.W., 2013. Plant Sterols the Better Cholesterol in Alzheimer's Disease? A Mechanistical Study. *J. Neurosci.* **33**(41), 16072–16087.
- Cahoon E.B., Shanklin J. & Ohlrogge J.B., 1992. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11184–11188.
- Calder P.C., 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**(suppl), 1505S–1519S.
- Carteau D., Bassani C. & Pianet I., 2007. The “Ouzo effect”: Following the spontaneous emulsification of trans-anethole in water by NMR. *Comptes Rendus Chim.* 1–6.
- Chobanov D., Agova M., Chooparova E. & Chaluckova R., 1966. Preparation of Pure Petroselinic Acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **43**, 625–626.
- Colombo M.L., 2010. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules* **15**, 2103–2113.
- Daniel M., 2006. *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*.

- Dayrit F.M., 2015. The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **92**, 1–15.
- Dejoye Tanzi C., 2013. Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant.
- Dupont F. & Guignard J.-L., 2012. *Botanique : les familles de plantes*, Issy-les-Moulineaux, 408.
- Favier A., 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* 108–115.
- Filliat P., 2012. Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs.
- Fine F., Abert Vian M., Fabiano Tixier A.-S., Carre P., Pages X. & Chemat F., 2013. Les agrosolvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *Oilseeds fats Crop. Lipids* **20**(5).
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**(1), 497–509.
- Fore S.P., Holmes R.L. & Bickford W.G., 1960. Preparation of Petroselinic Acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **37**, 490–491.
- Friedt W. & Lühs W., 1995. Development in the breeding of rapeseed oil for industrial purposes. *Oil Qual.* (D19), 437–448.
- Ghouati Y., Belaiche T., Ouhssine M., Amechrouq A., Tahiri A. & Chakir S., 2012. Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de fruits d'anis vert marocain (*). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **151**(1–4), 25–34.
- Gornay J., 2006. Transformation par voie thermique de triglycérides et d'acides gras. Application à la valorisation chimique des déchets lipidiques.
- Gunstone F.D., 2005. Vegetable Oils. In: Shahidi, F. ed. . John Wiley & Sons, Inc., 213–267.
- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G. & Rakesh D.D., 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Heimermann W.H., T H.R., Gordon D.T., Kowalyshyn D.E. & Jensen R.G., 1973. Effect of Double Bond Position in Octadecenoates upon Hydrolysis by Pancreatic Lipase. *Lipids* **8**(1), 45–47.
- Herzi N., 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles.
- HSDB A Toxnet Database (Toxicology Data Network), August-10-2017. . *U.S.National Libr. Med.* <https://toxnet.nlm.nih.gov/>, (10/08/2017).
- Iserin P., Masson M. & Restellini J.-P., 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.-P. eds., Larousse, Londres.
- ISO 9235:2013, 2013. . *ISO.* <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:fr>, (11/08/2017).
- Johnson S., Saikia N., Mathur H.B. & Agarwal H.C., 2009. Fatty acids profile of Edible Oils and Fats in India, New Delhi.
- Khan R.M., Ahmad W., Ahmad M. & Hasan A., 2016a. Phytochemical and Pharmacological Properties of *Carum carvi*. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **3**(6), 231–236.

- Khan R.M., Ahmad W., Ahmad M. & Hasan A., 2016b. Phytochemical and pharmacological properties of *Carum carvi*. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **3**(6), 231–236.
- Kleiman R. & Spencer, G F., 1982. Search for New Industrial Oils: XVI. Umbelliflorae - Seed Oils Rich in Petroselinic Acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**, 29–38.
- Kooti W., Moradi M., Ali-Akbari S., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M. & Ashtary-Larky D., 2015. Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J. HerbMed Pharmacol. J. J HerbMed Pharmacol* **4**(1), 1–9.
- Kurian A., 2012. Health benefits of herbs and spices. In: Limited, W.P. ed. *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. 72–88.
- Laugier J.-P. & Picard E., 1998. Utilisation d'une huile riche en acide pétrosélinique comme agent hydratant.
- Lecerf J.-M., 2007. Lipides et santé. *Cah. Nutr. Diététique* **42**, 1S24-1S33.
- Leger A., 2010. Analyse fonctionnelle d'AtMYB30, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*.
- Legrand P., 2007. Les acides gras : structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés. *Cah. Nutr. Diététique* **42**, 1S7-1S12.
- Li L., Tsao R., Yang R., Kramer J.K.G. & Hernandez M., 2007. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1164–1169.
- Lipophilicity, 2017. Cambridge MedChem Consult. <http://www.cambridgemedchemconsulting.com/>, (10/08/2017).
- Liu W., Fu Y.-J., Zu Y.-G., Tong M.H., Wu N., Liu X.-L. & Zhang S., 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chem.* **114**, 334–339.
- Lobo V., Patil A., Phatak A. & Chandra N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* **4**(8), 118–126.
- Lognay G., Lacoste F., Marlier M., Mordret F., Auge C., Raoux R., Wagstaffe P.J., Boenke A. & Severin M., 1993. The Certification of the Identity of Individual Sterols in Three BCR Oil and Fat Reference Materials by GC-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **95**(3), 98–104.
- Lognay G. & Marlier M., 1990. GC-MS Identification of the Sterols from Three BCR Reference Materials : Soya-Maize RM162, Pig-Beef fat blend RM163 and Butterfat RM164.
- Lubbe A. & Verpoorte R., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* **34**, 785–801.
- Lumb P.B. & Smith J.C., 1952. 982. Higher Aliphatic Compounds. PartX. A Synthesis of Tariric and Petroselinic Acids. *J. Chem. Soc.* (5032), 5032–5035.
- Macheix J.-J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., 2005. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, PPUR Presses polytechniques.
- Malhotra S.K., 2012a. Fennel and fennel seed. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. Woodhead Publishing Limited, 275–302.
- Malhotra S.K., 2012b. Caraway. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. Woodhead

- Publishing Limited, 225–248.
- Malnoe A., Baur M. & Fay L., 1999. Utilisation de l'acide pétrosélinique pour le traitement des inflammations des tissus superficiels.
- Marcus Y., 1993. The Properties of Organic Liquids that are Relevant to their Use as Solvating Solvents. *Chem. Soc. Rev.* 409–416.
- Medicinal & Aromatic Plants, March-28-2017. . *Omi. Int.* <https://www.omicsonline.org/medicinal-aromatic-plants.php>, (28/03/2017).
- Miraliakbari H. & Shahidi F., 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* **111**, 421–427.
- Murphy D.J., 1996. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol.* **14**, 206–213.
- Murphy D.J., Richards D., Taylor R., Capdevielle J., Guillemot J.-C., Grison R., Fairbairn D. & Bowra S., 1994. Manipulation of seed oil content to produce industrial crops. *Ind. Crops Prod.* **3**, 17–27.
- Navarrete A., Herrero M., Martin A., Cocero M.J. & Ibáñez E., 2011. Valorization of solid wastes from essential oil industry. *J. Food Eng.* **104**, 196–201.
- Ohlrogge J.B., 1994. Design of New Plant Products: Engineering of Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiol.* **104**, 821–826.
- Özgüven M., 2012. Aniseed. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. Woodhead Publishing Limited, 138–150.
- Pace V., Hoyos P., Castoldi L., Domínguez de Maria P. & R. Alcantara A., 2012. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **5**, 1369–1379.
- Pandey M.M., Vijayakumar M., Rastogi S. & Ajay K.S., 2012. Phenolic Content and Antioxidant Properties of Selected Indian Spices of Apiaceae. *J. Herbs. Spices Med. Plants* **18**(3), 246–256.
- Parmentier M., Guillemin S., Barbar R., Linder M. & Fanni J., 2004. De nouveaux procédés d'extraction des huiles pour des produits finis de haute qualité. *Oilseeds fats Crop. Lipids* **11**(6), 377–380.
- Peter M., 2008. Profil et métabolisme des acides gras dans les tissus de la perche commune *Perca fluviatilis* L.
- Peter K. V. & Nirmal Babu K., 2012. Introduction to herbs and spices: medicinal uses and sustainable production. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. 1–16.
- Pictogrammes CLP, n.d. . *Eur. Chem. Agency.* <https://echa.europa.eu/fr/chemicals-in-our-life/clp-pictograms>
- Placek L.L., 1963. A review on petroselinic acid and its derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**, 319–329.
- Pokorný J. & Pánek J., 2012. The effect of natural antioxidants in herbs and spices on food shelf-life. In: Limited, W.P. ed. *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. 51–71.
- Product Specification Sigma-Aldrich, August-10-2017. . *Sigma-Aldrich.* <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/296090?lang=fr®ion=BE&gclid=C>

j0KCQjwiLDMBRDFARIsACNmiX_xSH4d-hGMSLRQY_wZR-
bj_EBfo521ADpRPr_ob2DhfTmRiVYvIRoaAmeGEALw_wcB, (10/08/2017).

PubChem Substance and Compound databases, August-10-2017. . *PubChem*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, (10/08/2017).

Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. & Pouységu L., 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 586–621.

Rafia B., 2013. Phytosterols in Human Nutrition. *Int. J. Sci. Res. Rev.* **2**(2), 01–10.

Ramadan M.F., Kroh L.W. & Mörsel J.-T., 2003. Radical Scavenging Activity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) Crude Seed Oils and Oil Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6961–6969.

Rasooli I. & Allameh A., 2016. Caraway (*Carum carvi* L.) Essential Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc., 287–293.

Rather M.A., Dar B.A., Sofi S.N., Bhat B.A. & Qurishi M.A., 2016. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. J. Chem.* **9**, S1574–S1583.

Rocha L. & Fernandes C.P., 2016. Aniseed (*Pimpinella anisum*, Apiaceae) Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc., 209–213.

Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Karim A.A., Abbas K.A., Norulaini N.A.N. & Omar A.K.M., 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.* **95**(2), 240–253.

Shahidi F., 2013. Oilseed Processing and Fat Modification. In: *Biochemistry of Foods*. Elsevier, 363–384.

Shojaii A. & Fard M.A., 2012. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *Int. Sch. Res. Netw. ISRN Pharm.* 1–8.

Singh G., Kapoor I., Singh P., Heluani C. & Catalan C., 2008. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and oleoresins from anise seeds (*Pimpinella anisum* L.). *Int. J. Essent. Oil Ther.* **2**(September), 122–130.

Souri E., Amin G., Farsam H. & Barazandeh Tehrani M., 2008. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU J. Pharm. Sci.* **16**(2), 83–87.

Svoboda K. & Greenaway R., 2003a. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *Int. J. Aromather.* **13**(4), 196–202.

Svoboda K. P. & Greenaway R. I., 2003b. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *Int. J. Aromather.* **13**(4), 196–202.

Tassou C.C., Chorianopoulos N.G., Skandamis P.N. & Nychas G.-J.E., 2012. Herbs, spices and their active components as natural antimicrobials in foods. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2*. 17–50.




Thomé O.W., 1885. *Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz*.

Trautwein E.A. & Demonty I., 2007. Phytosterols: Natural compounds with established and emerging health benefits. *OCL - Ol. Corps Gras Lipides* **14**(5), 259–266.

- Tucker J.M. & Townsend D.M., 2005. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed. Pharmacother.* **59**, 380–387.
- Uddin S., Sarker Z.I., Ferdosh S., Akanda J.H., Easmin S., Shamsudin S.H.B., Yunus B. & Kamaruzzaman, 2014. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide : a review. *J. Sci. Food Agric.* (December 2013).
- Van Loon J., 1927. The composition of parsley seed oil. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **46**, 492–500.
- Weber N., Vosmann K., Brühl L. & Mukherjee K., 1997. Metabolism of dietary petroselinic acid: a dead-end metabolite of desaturation/chain elongation reactions. *Nutr. Res.* **17**(1), 89–97.
- Williams C.M., 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.* **49**, 165–180.
- Winkler-Moser J., n.d. Gas Chromatographic Analysis of Plant Sterols. *AOCS Lipid Libr.* <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40384>
- Yi C., Shi J., Kramer J., Xue S., Jiang Y., Zhang M., Ma Y. & Pohorly J., 2009. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chem.* **114**, 570–576.
- Zekovic Z., Pavlic B., Cvetanovic A. & Durovic S., 2016. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. *Ind. Crops Prod.* **94**, 353–362.
- Zlatanov M. & Ivanov S.A., 1995. Studies on sterol composition of some glyceride oils from family Apiaceae. *Fett* **97**, 381–383.

ANNEXES

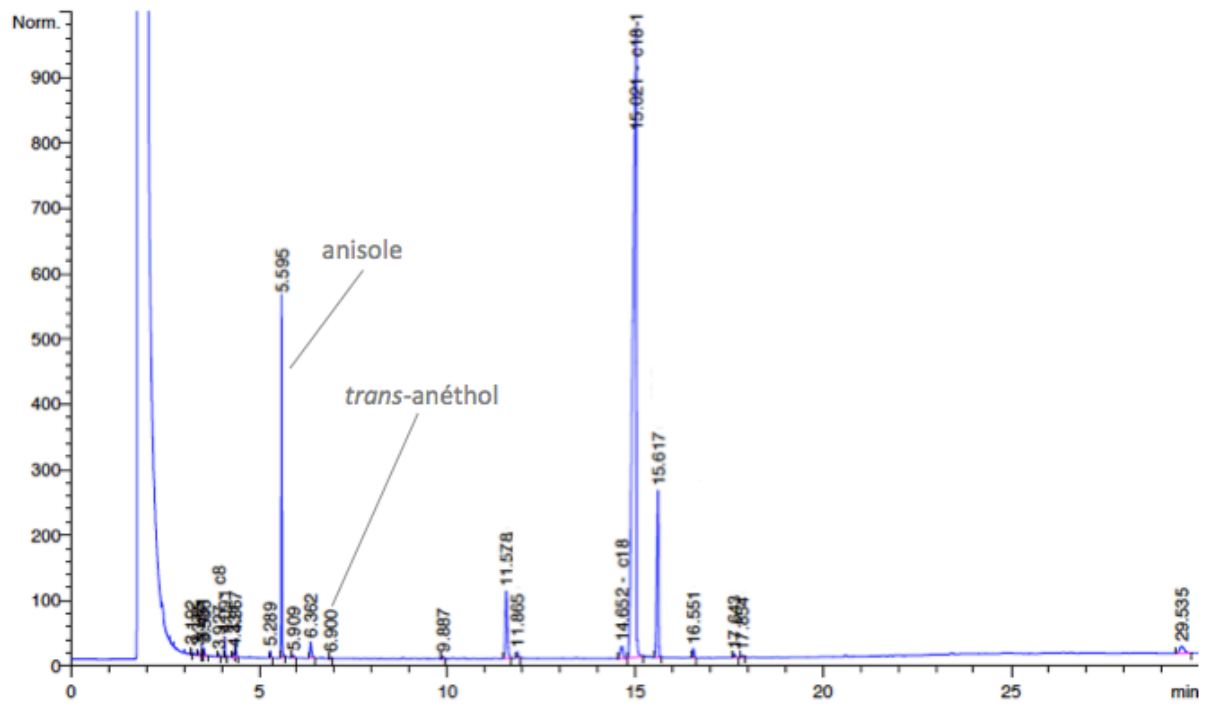
Annexe 1 : Pictogrammes de danger CLP et leurs significations, d'après ("Pictogrammes CLP," n.d.)

	<p>Peut irriter les voies respiratoires, provoquer somnolence ou vertiges, une allergie cutanée.</p> <p>Provoque une sévère irritation des yeux, une irritation cutanée.</p> <p>Nocif en cas d'ingestion, par contact cutané, par inhalation.</p> <p>Nuit à la santé publique et à l'environnement en détruisant l'ozone dans la haute atmosphère.</p>		<p>Inflammable</p>
	<p>Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires.</p> <p>Risque avéré d'effets graves pour les organes.</p> <p>Risque présumé d'effets graves pour les organes.</p> <p>Peut nuire à la fertilité ou au fœtus, provoquer le cancer, induire des anomalies génétiques, provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.</p>		<p>Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>
			<p>Mortel en cas d'ingestion, par contact cutané, par inhalation.</p> <p>Toxique en cas d'ingestion, par contact cutané, par inhalation.</p>
			<p>Contient un gaz sous pression; peut exploser sous l'effet de la chaleur.</p> <p>Contient un gaz réfrigéré; peut causer des brûlures ou blessures cryogéniques.</p>

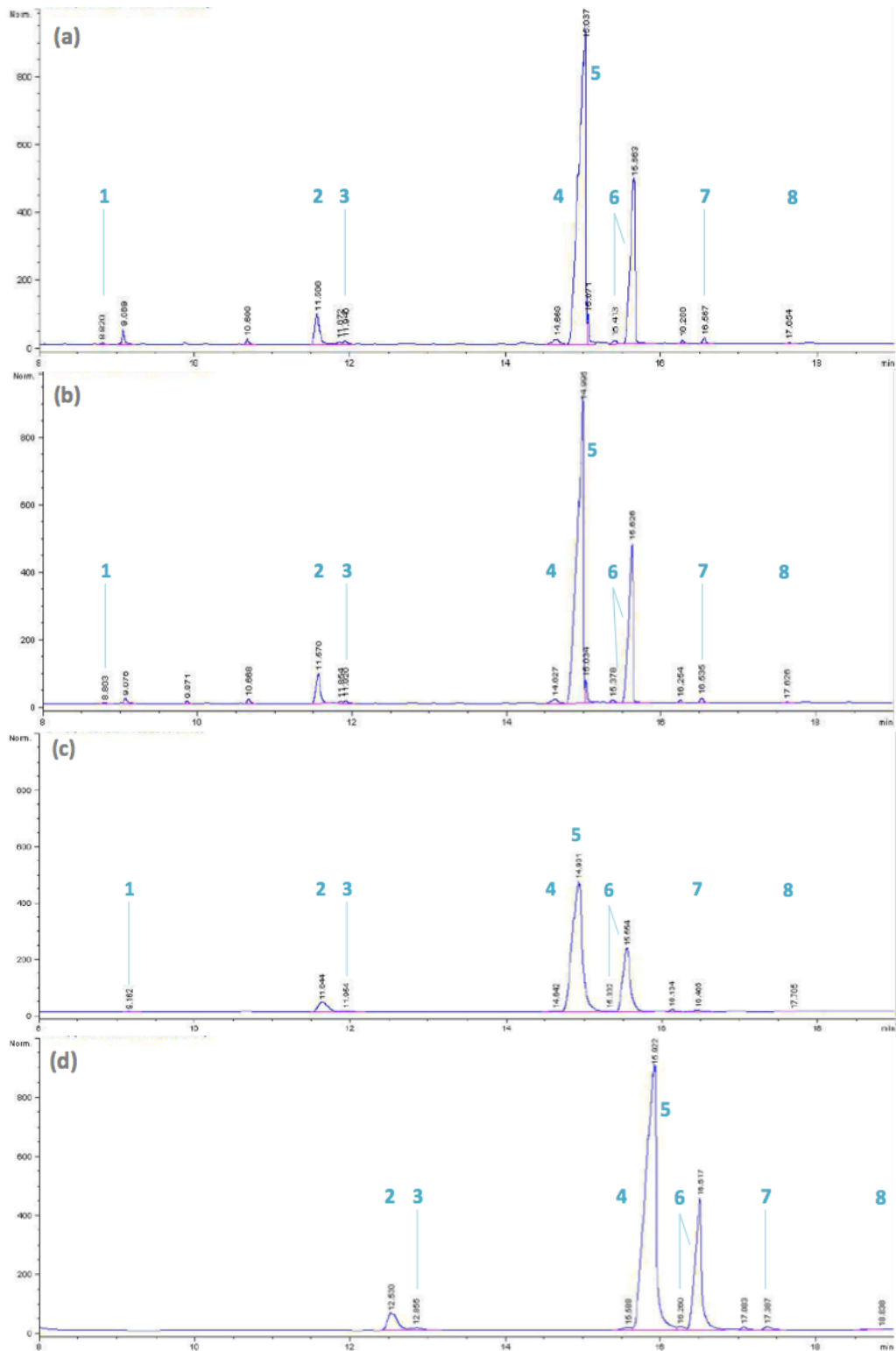
Annexe 2 : Rendements massiques d'extraction obtenus pour les différentes graines par les différentes méthodes d'extraction

	Soxhlet hexane	Folch	CO ₂ -SC	Soxhlet MeTHF
Rendements massiques d'extraction (g/100 g matière fraîche)				
Fenouil	16,097 ± 1,292	18,560 ± 1,733	12,899 ± 0,662	17,592 ± 0,492
Anis	15,499 ± 2,556	22,748 ± 1,837	16,701 ± 1,259	22,351 ± 0,711
Carvi	12,591 ± 0,235	18,553 ± 0,563	10,906 ± 1,773	16,712 ± 1,419
Rendements massiques d'extraction (g/100 g matière sèche)				
Fenouil	17,276 ± 1,387	19,920 ± 1,860	13,844 ± 0,711	18,881 ± 0,528
Anis	16,405 ± 2,706	24,077 ± 1,945	17,677 ± 1,333	23,657 ± 0,752
Carvi	13,376 ± 0,249	19,709 ± 0,598	11,585 ± 1,884	17,753 ± 1,507

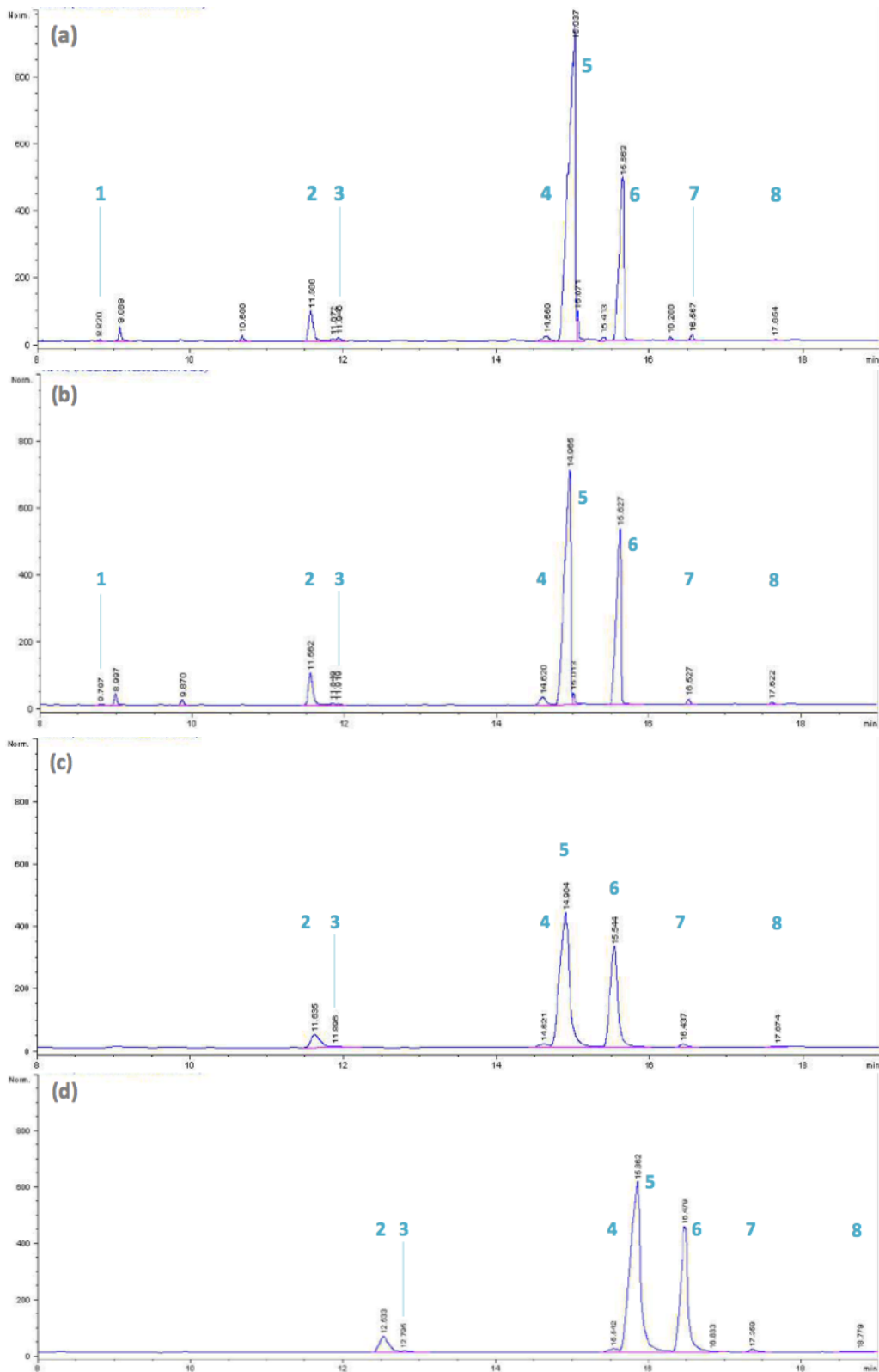
Annexe 3 : Chromatogramme de séparation d'EMAG d'une huile de fenouil obtenue par la méthode de Folch présentant des pics identifiés comme étant de l'anisole et du *trans*-anéthol



Annexe 5 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites d'anis vert (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO₂ supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane. Les pics identifiés correspondent aux esters méthyliques des acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0.



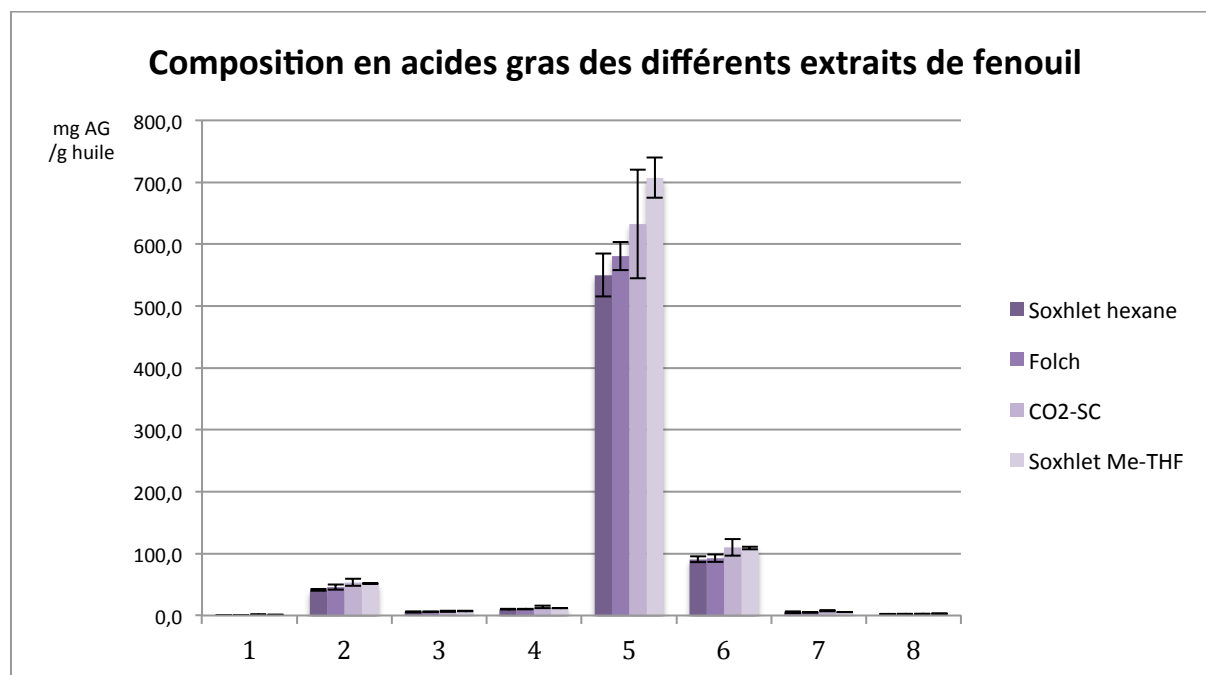
Annexe 6 : Chromatogrammes de séparation des EMAG des huiles extraites de carvi (a) par la méthode de Soxhlet à l'hexane, (b) par la méthode de Folch, (c) au CO2 supercritique et (d) par la méthode de Soxhlet au 2-méthyltétrahydrofurane. Les pics identifiés correspondent aux esters méthyliques des acides gras (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0.



Annexe 7 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites de fenouil

Acide gras	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
AGT	706,02 ± 43,24	744,36 ± 35,01	827,84 ± 110,02	896,68 ± 35,74
C14:0	0,64 ± 0,04	0,76 ± 0,13	1,05 ± 0,07	0,91 ± 0,05
C16:0	41,26 ± 1,22	45,98 ± 4,45	53,45 ± 5,49	51,67 ± 0,36
C16:1	5,62 ± 0,64	5,78 ± 0,44	6,61 ± 0,72	7,06 ± 0,16
C18:0	9,91 ± 0,35	10,60 ± 0,61	13,94 ± 2,03	12,07 ± 0,09
C18:1	550,02 ± 34,71	580,66 ± 22,55	632,69 ± 87,80	707,33 ± 32,30
C18:2	90,89 ± 4,66	92,54 ± 5,87	109,89 ± 13,15	109,11 ± 2,21
C18:3	5,48 ± 1,46	5,27 ± 0,77	7,52 ± 0,71	2,91 ± 0,10
C20:0	2,20 ± 0,17	2,77 ± 0,20	2,70 ± 0,06	2,91 ± 0,48

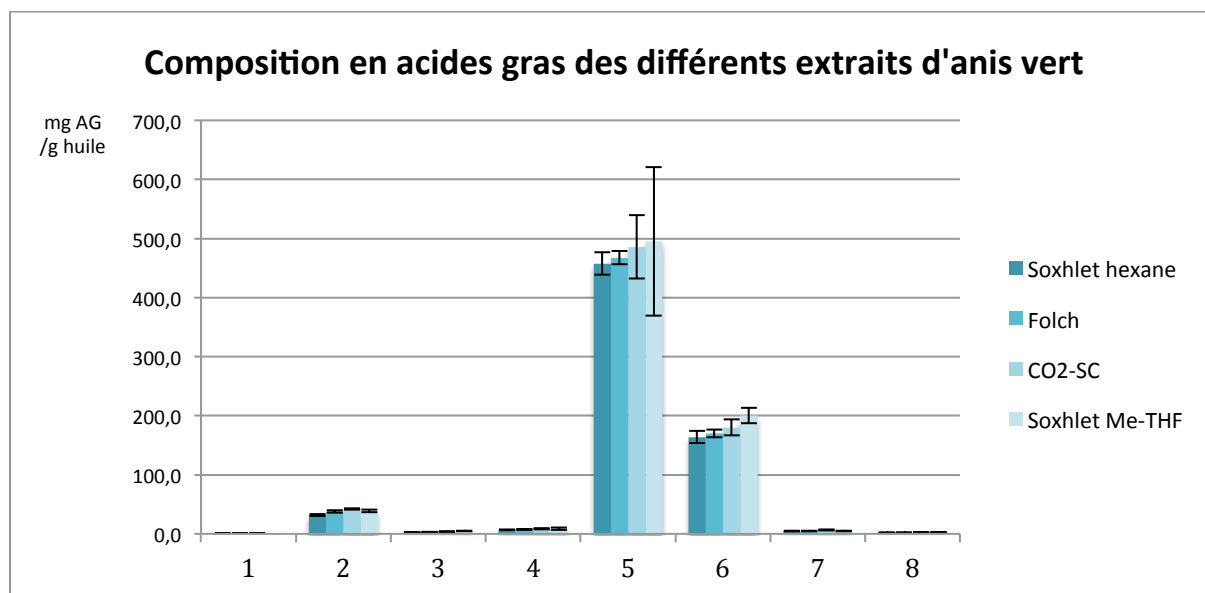
Annexe 8 : Teneurs en acides gras des huiles extraites de fenouil (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0



Annexe 9 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites d'anis vert

Acide gras	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
AGT	669,85 ± 32,95	693,68 ± 20,62	729,55 ± 70,49	756,29 ± 145,07
C14:0	0,51 ± 0,10	0,65 ± 0,02	0,60 ± 0,07	0,71 -
C16:0	32,14 ± 1,80	37,85 ± 1,90	41,96 ± 1,38	39,08 ± 2,49
C16:1	2,65 ± 0,15	3,48 ± 0,19	3,82 ± 0,29	4,81 ± 0,24
C18:0	6,58 ± 0,38	7,25 ± 0,27	8,48 ± 0,79	8,79 ± 2,03
C18:1	457,06 ± 19,34	467,52 ± 11,03	485,68 ± 53,74	495,11 ± 126,17
C18:2	164,06 ± 10,40	169,96 ± 6,49	180,07 ± 13,46	200,37 ± 13,18
C18:3	4,37 ± 0,64	5,00 ± 0,61	6,47 ± 0,67	4,99 ± 0,64
C20:0	1,87 ± 0,14	2,22 ± 0,12	2,47 ± 0,10	2,45 ± 0,31

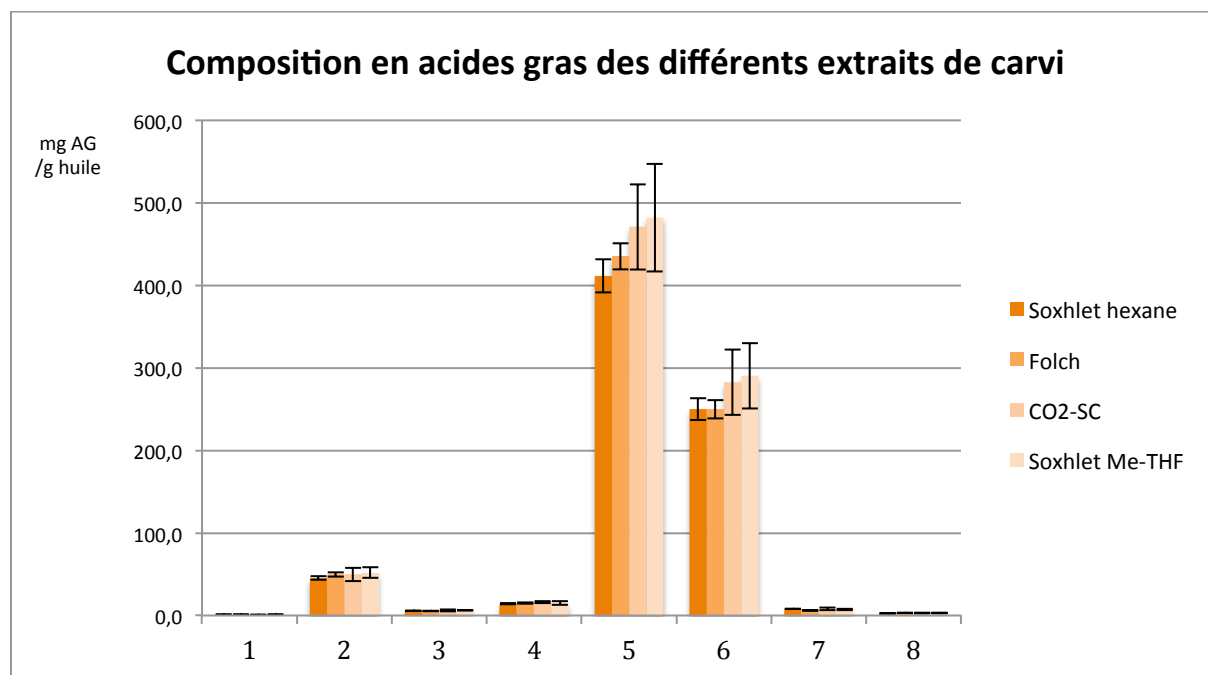
Annexe 10 : Teneurs en acides gras des huiles extraites d'anis vert (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0



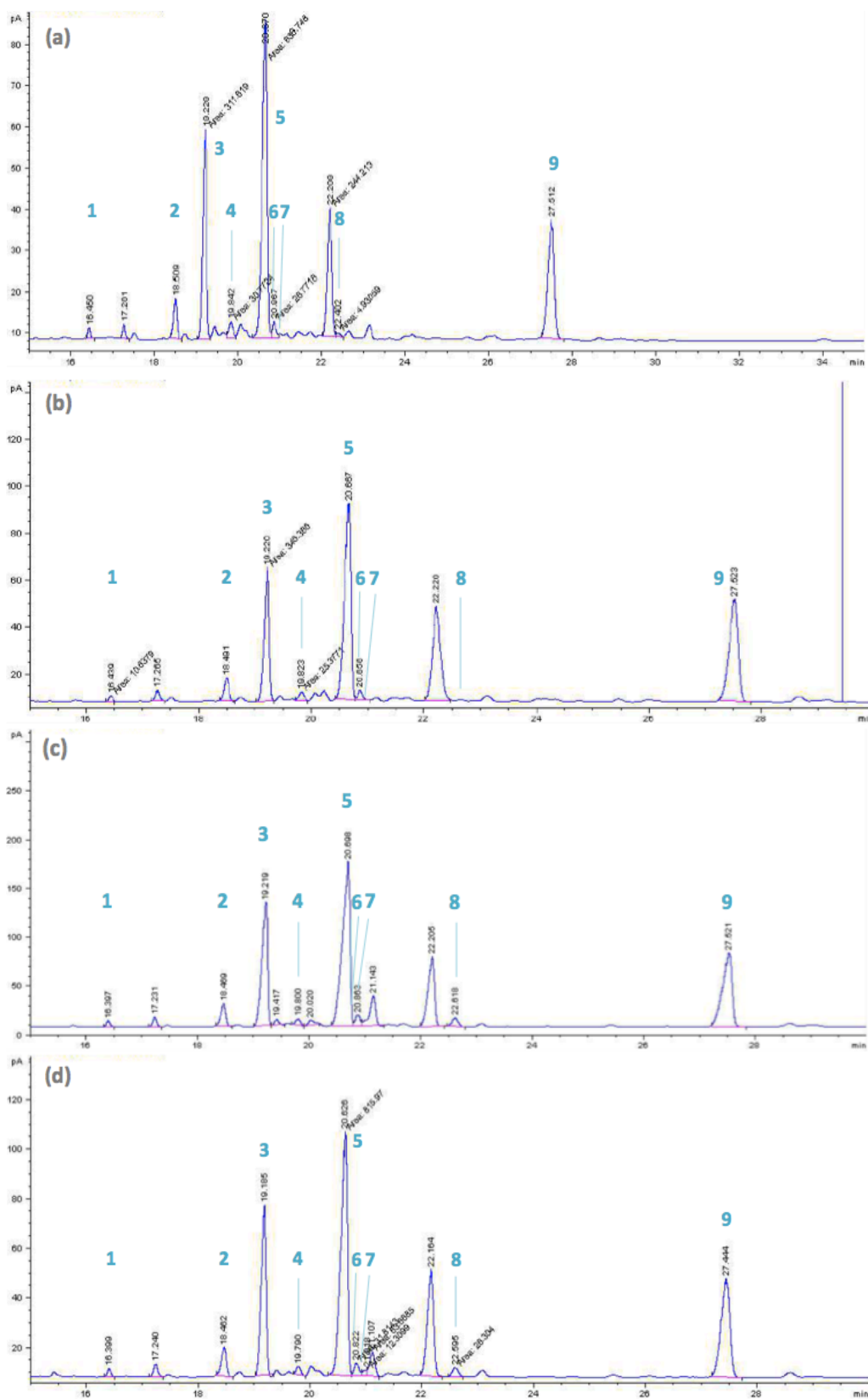
Annexe 11 : Moyennes et écarts-types des teneurs en acides gras des huiles extraites de carvi

Acide gras	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
AGT	739,01 ± 37,34	765,58 ± 31,20	837,38 ± 104,05	857,06 ± 115,04
C14:0	0,93 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,87 ± 0,21	0,91 ± 0,08
C16:0	45,66 ± 2,33	49,69 ± 2,46	49,73 ± 8,03	51,90 ± 6,23
C16:1	5,84 ± 0,27	5,44 ± 0,25	6,05 ± 1,00	6,34 ± 0,22
C18:0	14,35 ± 0,72	15,07 ± 0,73	16,32 ± 1,32	15,18 ± 2,25
C18:1	411,75 ± 20,20	435,21 ± 15,78	470,87 ± 51,81	482,08 ± 65,16
C18:2	249,98 ± 13,35	249,97 ± 11,12	282,50 ± 39,64	290,27 ± 39,73
C18:3	8,10 ± 0,30	6,30 ± 0,57	8,10 ± 1,61	7,39 ± 1,05
C20:0	2,390 ± 0,120	3,046 ± 0,174	2,954 ± 0,428	2,993 ± 0,324

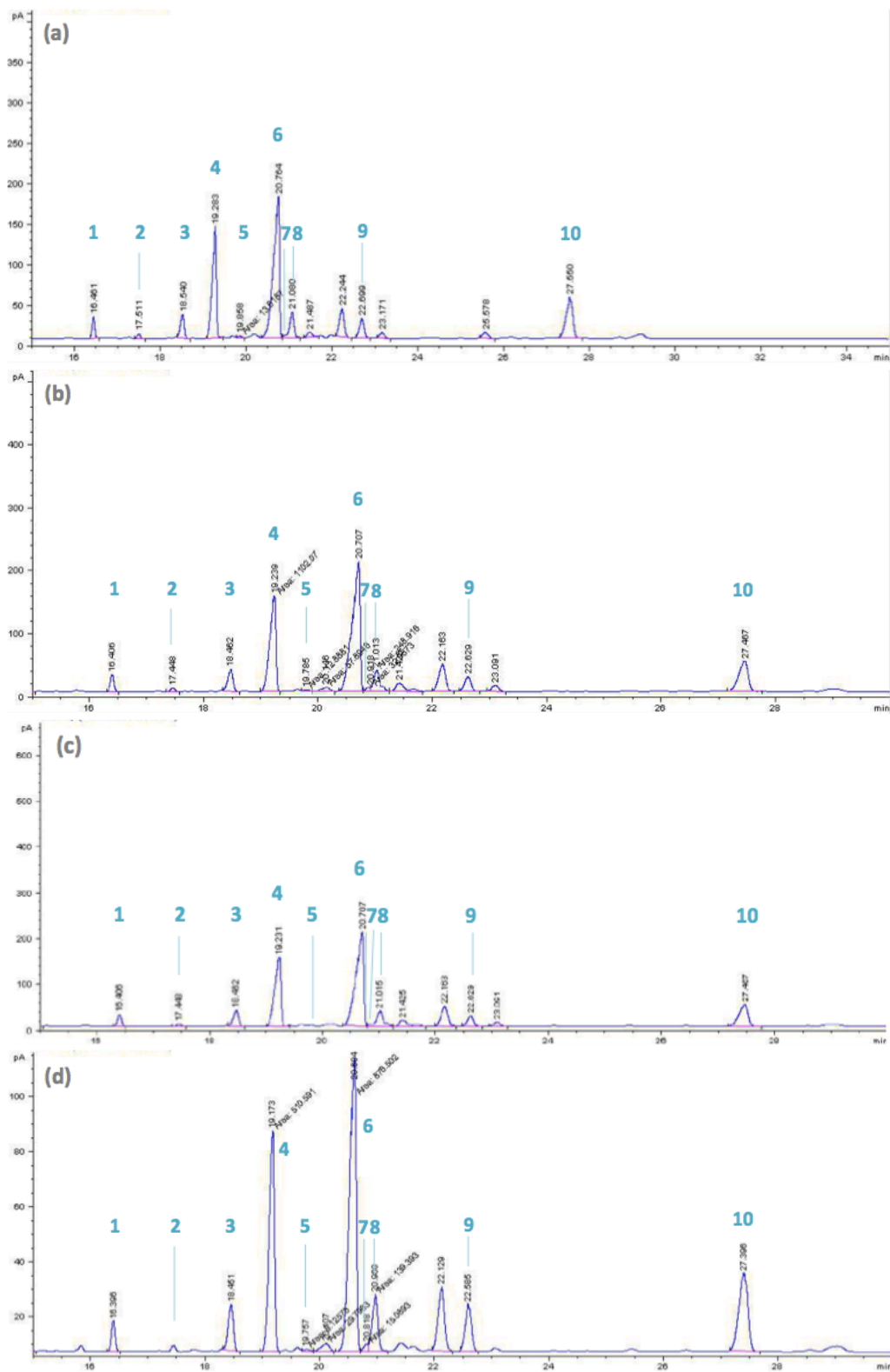
Annexe 12 : Teneurs en acides gras des huiles extraites de carvi (1) C14:0, (2) C16:0, (3) C16:1, (4) C18:0, (5) C18:1, (6) C18:2, (7) C18:3 et (8) C20:0



Annexe 13 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits d'anis vert obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO₂-SC et (d) Soxhlet au MeTHF. Les pics identifiés correspondent au (1) cholestérol, (2) campestérol, (3) stigmastérol, (4) Δ^7 -campestérol, (5) β -sitostérol, (6) sitostanol, (7) Δ^5 -avenastérol, (8) Δ^7 -avenastérol et (9) bétuline, SI.



Annexe 14 : Chromatogrammes de séparation des stérols triméthylsilylés des différents extraits de carvi obtenus par (a) Soxhlet à l'hexane, (b) Folch, (c) CO₂-SC et (d) Soxhlet au MeTHF. Les pics identifiés correspondent au (1) cholestérol, (2) cholest-7-enol, (3) campestérol, (4) stigmastérol, (5) Δ^7 -campestérol, (6) β -sitostérol, (7) sitostanol, (8) Δ^5 -avenastérol, (9) Δ^7 -avenastérol et (10) bétuline, SI.



Annexe 15 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites de fenouil

Stérol	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
Stérols totaux	4,19 ± 0,30	3,27 ± 0,34	4,64 ± 0,24	3,65 ± 0,33
Cholestérol	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,0	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Campestérol	0,32 ± 0,06	0,29 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,32 ± 0,03
Stigmastérol	2,17 ± 0,11	1,66 ± 0,11	2,23 ± 0,09	1,70 ± 0,16
Δ ⁷ -campestérol	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01
β-sitostérol	1,26 ± 0,04	1,15 ± 0,16	1,61 ± 0,04	1,24 ± 0,11
Sitostanol	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Δ ⁵ -Avenastérol	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,00
Δ ⁷ -Avenastérol	0,19 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,01

Annexe 16 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites d'anis vert

Stérol	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
Stérols totaux	3,43 ± 0,36	2,44 ± 0,27	3,86 ± 0,67	2,90 ± 0,26
Cholestérol	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Campestérol	1,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,02
Stigmastérol	0,98 ± 0,10	0,72 ± 0,08	1,18 ± 0,18	0,85 ± 0,08
Δ ⁷ -campestérol	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
β-sitostérol	1,94 ± 0,11	1,45 ± 0,15	2,18 ± 0,39	1,70 ± 0,14
Sitostanol	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01
Δ ⁵ -Avenastérol	0,02 -	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Δ ⁷ -Avenastérol	0,11 ± 0,08	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,00

Annexe 17 : Moyennes et écarts-types des teneurs en stérols des huiles extraites de carvi

Stérol	Soxhlet hexane (mg/g huile)	Folch (mg/g huile)	CO ₂ -SC (mg/g huile)	Soxhlet MeTHF (mg/g huile)
Stérols totaux	6,45 ± 0,27	4,53 ± 0,20	7,26 ± 0,47	5,38 ± 0,39
Cholestérol	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,15 ± 0,01
Cholest-7-enol	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Campestérol	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,31 ± 0,20
Stigmastérol	1,79 ± 0,10	1,43 ± 0,06	2,04 ± 0,12	1,51 ± 0,90
Δ ⁷ -campestérol	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
β-sitostérol	3,21 ± 0,08	2,41 ± 0,11	3,61 ± 0,20	2,57 ± 0,15
Sitostanol	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Δ ⁵ -Avenastérol	0,41 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,40 ± 0,05
Δ ⁷ -Avenastérol	0,34 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,36 ± 0,06	0,35 ± 0,06

Annexe 18 : Activité antiradicalaire des différentes graines par type d'extraction

% activité antiradicalaire (par rapport à trolox 10^{-3} M = 100 %)				
	Soxhlet hexane	Folch	CO ₂ -SC	Soxhlet MeTHF
Fenouil	34,02 ± 10,86	38,56 ± 5,73	69,58 ± 4,98	49,23 ± 10,04
Anis	58,32 ± 8,60	81,82 ± 5,73	92,99 ± 0,67	87,04 ± 3,69
Carvi	69,14 ± 10,01	49,12 ± 6,83	91,44 ± 1,14	93,46 ± 0,20

Annexe 19 : Récapitulatif des tests statistiques effectués. Les conditions d'application sont la normalité des populations, l'égalité des variances de celles-ci. L'hypothèse nulle du test est l'égalité des moyennes. Une p-valeur < 0,05 signifie un rejet significatif de l'hypothèse nulle (*), < 0,01 un rejet hautement significatif (**) et < 0,001 un rejet très hautement significatif (***). Les groupements sont les résultats des structurations des moyennes. Les moyennes ne partageant pas de lettre sont significativement différentes.

Rendements massiques d'extraction									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction			
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi	
	Ca An Fe	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 B	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A (2)	RH ₀ *** 0,000 A (1)
		B	A	A	B	B	C	C	C
		C	C	B	C	C	D	B	
						CO ₂ -SC			
						MeTHF			
						Folch			
						Hexane			
Acides gras totaux									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction			
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi	
	Ca Fe An	0,155	RH ₀ * 0,038 A	0,370	0,259	R* 0,023 A	0,487	0,297	
			A B			A B	B C		
			B			C			
						MeTHF			
						CO ₂ -SC			
						Folch			
						Hexane			
Acides gras : C18:1									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction			
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi	
	Fe An Ca	RH ₀ ** ,002 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ * 0,045 A	RH ₀ * 0,029 A	RH ₀ * 0,025 A	0,907	0,252	
		B	B	B	B	A B			
		B	B	B	B	B			
						CO ₂ -SC			
						MeTHF			
						Folch			
						Hexane			
Acides gras : C18:2									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction			
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi	
	Ca An Fe	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ * 0,025 A	RH ₀ * 0,019 A	0,271	
		B	B	B	B	A	A B		
		C	C	C	C	B	B		
						CO ₂ -SC			
						MeTHF			
						Folch			
						Hexane			
Acides gras : C16:0									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction			
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi	
	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A	RH ₀ * 0,010 A	0,113	RH ₀ * 0,010 A	RH ₀ * 0,012 A	RH ₀ ** 0,002 A	0,575	
		B	A		A	A B	A B		
		C	B		B	B C	B		
						CO ₂ -SC			
						MeTHF			
						Folch			
						Hexane			

Acides gras : C18:0									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				CO ₂ -SC MeTHF Folch Hexane	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ ** 0,002 A A B	RH ₀ * 0,012 A A B B	RH ₀ ** 0,008 A A B B C C	0,126	0,433	
Acides gras : C18:3									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				CO ₂ -SC MeTHF Hexane Folch	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca Fe An	RH ₀ ** 0,007 A B B	0,108	0,253	RH ₀ * 0,015 A B B	0,051 A B B B	RH ₀ * 0,020 A B (3) B (4) B (2)	0,176	
Acides gras (relatif) : C18:1									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				MeTHF Hexane Folch CO ₂ -SC	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Fe An Ca	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B B C	RH ₀ *** 0,000 A A A C	RH ₀ *** 0,000 A C B D	
Acides gras (relatif) : C18:2									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				CO ₂ -SC Hexane Folch MeTHF	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca An Fe	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B B C C	RH ₀ *** 0,000 A B C C B	RH ₀ *** 0,000 A A B C B	
Acides gras (relatif) : C16:0									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				Folch CO ₂ -SC Hexane MeTHF	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C D	RH ₀ *** 0,000 A A B B	RH ₀ *** 0,000 A B B C	
Acides gras (relatif) : C18:0									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				Folch Hexane CO ₂ -SC MeTHF	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C -	RH ₀ *** 0,000 A B C D	
Acides gras (relatif) : C18:3									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				CO ₂ -SC Folch Hexane MeTHF	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca An Fe	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C D	RH ₀ *** 0,000 A B B (4) B (3)	RH ₀ *** 0,000 A A B C	
Stérols totaux									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Comparaison graines				CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	Comparaison méthodes d'extraction			
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi	
Groupements	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ ** 0,001 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	0,306 A A B B C C	RH ₀ * 0,010 A A B B C C	RH ₀ *** 0,000 A B C D	

Stérols : stigmasterol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Fe Ca An	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A A B	RH ₀ *** 0,000 A A B	CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	RH ₀ ** 0,001 A A B B	RH ₀ ** 0,007 A A B B C C	RH ₀ *** 0,000 A B C C
Stérols : β-sitostérol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Ca An Fe	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B C	CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	RH ₀ ** 0,002 A B B B	RH ₀ * 0,021 A A B B C C	RH ₀ *** 0,000 A B C C
Stérols : campesterol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Ca Fe An	RH ₀ ** 0,002 A A B	RH ₀ *** 0,000 A A B	RH ₀ *** 0,000 A A B	RH ₀ *** 0,000 A A B	CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	0,076 A A B B C C	RH ₀ ** 0,005 A A B B C C	RH ₀ *** 0,000 A B C C
Stérols : cholestérol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	RH ₀ * 0,034 A A A B B	0,096 A A B B B	RH ₀ *** 0,000 A A B B
Stérols : Δ ⁵ -avenastérol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Ca Fe An	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A - B	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B B	CO ₂ -SC Hexane MeTHF Folch	RH ₀ * 0,038 A B A	RH ₀ * 0,014 A B C A B C	RH ₀ *** 0,000 A B B C
Stérols : Δ ⁷ -avenastérol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	Fe An Ca	RH ₀ *** 0,000 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	RH ₀ ** 0,001 A B B	RH ₀ *** 0,000 A B C	Hexane CO ₂ -SC MeTHF Folch	RH ₀ ** 0,003 A A A B	RH ₀ *** 0,000 A A A B B	RH ₀ *** 0,000 A A A B
Stérols : Sitostanol									
CA Norm. pop. CA Egal. var. p-val ég. moy.	Groupements	Comparaison graines					Comparaison méthodes d'extraction		
		Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF		Fenouil	Anis	Carvi
	An Ca Fe	RH ₀ ** 0,004 A B B	RH ₀ * 0,010 A A B	RH ₀ ** 0,002 A B C	RH ₀ ** 0,001 A B C	Hexane CO ₂ -SC MeTHF Folch	RH ₀ ** 0,001 A B B B	RH ₀ * 0,037 A A B B B	RH ₀ * 0,022 C A B C A B

Stérols : cholest-7-enol										
	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction					
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi			
CA Norm. pop.	-	-	-	-	-	-	-			
CA Egal. var.	-	-	-	-	-	-	-			
p-val ég. moy.	-	-	-	-	-	-	RH ₀ *** 0,000			
Groupements	-	-	-	-	Hexane	-	-	A		
	-	-	-	-	CO₂-SC	-	-	A		
	-	-	-	-	MeTHF	-	-	B		
	-	-	-	-	Folch	-	-	B		
Activité antioxydante										
	Comparaison graines				Comparaison méthodes d'extraction					
	Hexane	Folch	CO ₂ -SC	MeTHF	Fenouil	Anis	Carvi			
CA Norm. pop.										
CA Egal. var.										
p-val ég. moy.										
Groupements					Ca	RH ₀ *** 0,000	RH ₀ *** 0,000	RH ₀ *** 0,000	RH ₀ *** 0,000	
					An	A	B	A	A	A (2)
					Fe	B	A	A	B	A (1)
						C	C	B	C	C
					CO₂-SC					
					MeTHF					
					Folch					
					Hexane					