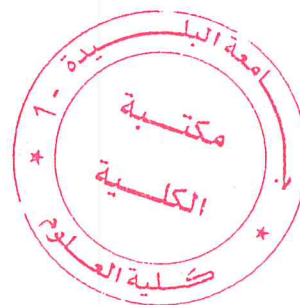


République Algérienne Démocratique et Populaire**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique****Université BLIDA 1****Faculté des Sciences****Département de Chimie**

Mémoire Présenté par

M^{elle} DAHMANI SIHAM**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des Substances Naturelles

Titre

**L'EFFET DES ENZYMES (CELLULASE, PECTINASE) SUR L'EXTRACTION
DE L'HUILE DES GRAINES DE «lépidium sativum L ». EVALUATION DE
L'ACTIVITE BIOLOGIQUE**

Soutenu publiquement en Septembre 2014 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida I
S. Kasmi	MCB	Examineur	Université de Blida I
K. Boutemak	MCB	Promoteur	Université de Blida I

Promotion 2013-2014

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite

*J'adresse mes plus vifs remerciements à ma promotrice **Dr.K.BOUTEMAK** docteure à l'université Saad Dahleb de Blida, pour son aide, ses conseils précieux, sa patience et sa disponibilité qui ont donné vie à ce travail malgré ses charges.....Merci.*

*Je remercie également le **Pr. M. EL HATTAB**, Professeur à l'université Blida 1, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et qui, durant ces deux années m'a gratifiée de son savoir et son aide scientifique avec générosité.*

*Mes remerciements vont également au Pr. **Y. DAGHBOUCHE**, et au Dr. **N. BOUZIDI**, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.*

*J'adresse mes remerciements particuliers à Mme **S. KASMI**, Responsable du Master Chimie des Substances Naturelles, et lui voue tous mes respects pour sa modestie, son aide et sa précieuse présence pour l'accomplissement de mon travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements au Pr. **Y. DAGHBOUCHE**, pour l'honneur qu'elle ma fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Mes remerciements les plus sincères vont à M^{elle} **ZERDOUMI ASMA** et M^{er} **IDIR.M** de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BATNA.*

*Je n'oublie surement pas mes collègues et amies surtout : **SOFIANE, AICHA et ISLAM**
qui ont contribué par leur soutien et amitié Chacun par sa façon à la progression de mon
travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante*

*Finalement un très grand merci pour tous qui ont contribue de prés ou de loin à la
réalisation de ce travail*

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas
et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant
toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné
confiance, courage et sécurité.*

*A mon chère père qui m'appris le sens de la persévérance tout au
Long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses
Encouragements.*

A

Ma très chère grand-mère

Mani « TATA »

A

Ma très chère sœur

NOUR EL HOUDA

A

Mes chers Frères

BADRO, KAMEL et NABIL

A

Mes chères tantes

FATIHA, LIELA, SALIMA, FARIDA, NASSIRA

A

MES AMIS

*SOFIANE, ISLAM, AICHA, IMENE, KARIMA, HOCINE, KADER,
WISSAM, NABIL, ISHAK, ADEL, SARA, KINDA, HANENE,
HAYET ET HASSIBA.*

*Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidé toujours à avancer
vous êtes tous des grands amis si gentils, merci d'être toujours près de
moi, amis avec les quels je souris.*

SIHAM

Résumé

Ce travail présente les résultats d'une étude menée sur l'effet de l'enzyme (cellulase et pectinase) sur le rendement, la composition chimique et son impact sur l'activité antibactérienne et antioxydante de l'huile végétale de *Lépidium sativum* L. extraite par soxhlet.

Le rendement obtenu est de 10.99% pour l'huile végétale broyée sans prétraitement enzymatique et 4.01%, 3.56% pour le prétraitement enzymatique cellulase, pectinase respectivement, la cinétique d'extraction nous a permis de déduire qu'après 1.30H d'extraction, la totalité de l'HV est récupérée.

La composition chimique des graines de cresson alénois a été déterminée par GC-MS, les composés sans prétraitement enzymatique sont : acide Benzenepropanoïque, alpha (hydroxyimino), 4-bicyclo[2-2-1]hepta-2,5-diene-7-yl-oxy benzonitril., acide N - hexadecanoïque , z,z,4-16, octadecadien-1-ol acetate et avec prétraitement enzymatique sont : 4-bicyclo[2-2-1] hepta-2.5-diene-7yl-oxy benzonitrile , acide eicosanoïque, acétate 10-propyl-[E]-5,9-tridecadienyl

Les résultats des tests d'activité antibactérienne effectués par la méthode de diffusion sur gélose ont montré une sensibilité avec une zone d'inhibition qui est de l'ordre de 16 à 40 mm pour le prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase) et aucune sensibilité pour l'huile végétale sans prétraitement enzymatique contre *Escherichia coli*, *salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilise*.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH a révélé que l'huile es présentait un pouvoir antioxydant relativement faible ; 2.32 mg/ml pour l'huile sans prétraitement enzymatique et 2.34, 2.35 mg/ml pour le prétraitement enzymatique cellulase et pectinase respectivement contre un EC50 égale à 0,46 mg/ml pour la vitamine C

Mots clés : cresson alénois, huile végétale, prétraitement enzymatique, CG-MS, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Abstract

This work aims to study the effect of the enzyme (cellulase and pectinase) on the yield, the chemical composition and its impact on the antibacterial and antioxidant activities of the *Lepidium sativum* seed oil extracted by soxhlet.

The yield obtained is 10.99% for the oil extracted without enzymatic pretreatment and 4.01%, 3.56% for the cellulase, pectinase pre-treatment respectively, the kinetics of extraction enabled us to deduce that after 1.30H of extraction, the totality of the oil is recovered.

The chemical composition of garden cress seeds was determined by GC/MS, the compounds without enzymatic pretreatment are: Benzene propanoic acid, α (hydroxyimino), 4-bicyclo[2-2-1] hepta-2,5-diene-7-yl-oxy benzonitril, N-hexadecanoic acid, z,z,4-16, octadecadien-1-ol acetate with enzymatic pretreatment are 4-bicyclo[2-2-1] hepta-2.5-diene-7yl-oxy benzonitrile, eicosanoic acid, 10-propyl-[E]-5,9-tridecadienyl acetate

The results of antimicrobial activity were carried out using agar diffusion method showed a sensitivity with inhibition zone in order of 16 to 40 mm for cellulase, and pectinase pre-treatment and no sensitivity for vegetable oil without enzyme pretreatment against *Escherichia coli*, *salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilizes*.

The evaluation of antioxidant activity by DPPH radical screening assay revealed that the oil presented a low antioxidant capacity; 2.32 mg/ml for oil without pre-treatment and 2.34, 2.35 mg/ml for cellulase and pectinase pretreatment respectively against a EC50 equalizes to 0,46 mg/ml for the vitamin C.

Key words: garden Cresson, vegetable oil, enzymatic pretreatment, GC/MS, antibacterial activity, antioxidant activity.

ملخص

عملنا يتركز على نتائج دراسة حول تأثير الانزيم (سلولاز وبكتيناز) على المحصول والتركيب الكيميائي وتأثيره على نشاط مضاد للبكتيريا ومضاد للأكسدة من الزيت النباتي لبذور حب الرشاد المستخرجة من سوكسليت.

بمردود يقدر بـ 10.99% على أرض الواقع للزيت النباتية المعالجة بدون انزيم وبمردود 4.01%، 3.56% على الزيت المعالجة بانزيم سلولاز، بكتيناز على التوالي، وتم تعيين المدة المثلى لاستخراج الزيت بـ 1.30 ساعة.

-تم تحديد التركيب الكيميائي لبذور حب الرشاد بواسطة كروماتوغرافية الغازية/ الوصف الكمي على المركبات التالية :

اسيد -الفا-هدروكسي امينو بنزانبروبانويد , 4-بيسكلو[1-2-2]هبتا-2.5-ديان-7-ايل- اوكسي بنزونتريل , اسيد ن-هكسد يكتويك , ز.ز-4-16, اوكتاديكادينان-1-اول اسيتات , و المركبات الزيتية المعالجة بانزيم سيليلاز و بيكتيناز هم: 4-بيسكلو[1-2-2]هبتا-2.5-ديان-7-ايل- اوكسي بنزونتريل , اسيد ايكوسانويك , اسيتات 10- بروبيل-[أ]-9.5- تريديكادينيل.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقة النشر الوسط الصلب للزيت المعالجة بانزيم سلولاز و البيكتيناز لها حساسية بقيمة 16 الى 40 مم و لا توجد اي حساسية للزيت بدون معالجة لسلالة الجراثيم ضد الإشريشيه كولي، السالمونيلا تيفي، ستافيلوكوكوس اوريوس , بسيلوس سوبتسلوس.

كشف تقييم

DPPH ان EC50 سلولاز و بكتيناز منخفضة نسبيا بـ 2,35 مل/مل 2,34 مل/مل بالنسبة لفتامين س 0.46 مل/مل

كلمات البحث : حب الرشاد , زيت نباتية , معالجة الانزيمية , مضاد البيكتيريا , مضاد الاكسدة.

Liste des abréviations

AGS	: Acide Gras Saturée
AGI	: Acide Gras Insaturée
HV	: Huile Végétale
CG-SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplé par Spectrométrie de Masse
UV	: Ultra - Violet
Vis	: Visible
BF₃	: tri fluore de Borre
Vit C	: Vitamine C
W	: Weight: poids
%	: Pourcent
ATCC	: American Type Culture Collection
°C	: Degré Celsius
DPPH	: 2, 2-Diphenylpicrylhydrazyl
g	: Gramm
min	: Minute
pH	: Potentiel Hydrogène
S.P.Enz	: Sans Prétraitement Enzymatique
A.P.Enz	: Avec Prétraitement Enzymatique
Tex	: Temps d'extraction
Tin	: Temps d'incubation

La liste des figures

Figure 1 : acide gras	4
Figure 2 : acide cis (a) et tans (b) oléique	7
Figure 3 : <i>Cresson Alénois</i>	13
Figure 4 : les tiges de <i>Cresson Alénois</i>	14
Figure 5 : les feuilles de <i>Cresson Alénois</i>	15
Figure 6 : les fleurs de <i>Cresson Alénois</i>	15
Figure 7 : Les fruits de <i>Cresson Alénois</i>	15
Figure 8 : les graines de cresson alénois	15
Figure 9 : les molécules des dix alcaloïdes imidazoliques	19
Figure 10 : la formulation de mucilage des graines de <i>Cresson Alénois</i>	24
Figure 11 : les graines de <i>Cresson Alénois</i> utilisé	27
Figure 12 : montage de soxhlet	29
Figure 13 : Pycnomètre	66
Figure 14 : Polarimètre	66
Figure 15 : Réfractomètre	67
Figure 16 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester	68
Figure 17 : la zone d'hnibition	36
Figure 18 : variation du rendement en fonction de la masse sans et avec broyage	40
Figure 19 : variation du rendement en fonction du temps d'incubation	42
Figure 20 : Evolution du rendement de l'huile végétale des gaines de cresson alénois broyé avec prétraitement enzymatique cellulase et pectinase en fonction de la concentration enzymatique	43
Figure 21 : le mucilage	43
Figure 22 : huile végétale des graines de cresson alénois	45
Figure 23 : profil chromatographique d'analyse de l'huile végétale des graines de cresson alénois sans prétraitement	48

Figure 24 : profil chromatographique d'analyse de l'huile végétale des graines de cresson alénois avec prétraitement (sillulase, pectinase) 49

Figure 25 : Aromatogramme des deux bactéries gram (-) E.coli et S.typhi des trois huiles A, B, C 50

Figure 26 : Aromatogramme des deux bactéries gram (+) S.aureus et B.subtilis des trois huiles A, B, C 51

Figure 27 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries 52

Figure 28 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH de vitamine E, de l'huile sans et avec prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase) des graines de cresson alénois 53

Figure 29 : Comparaison des valeurs EC50 de notre huile et la vitamine E 54

Liste des tableaux

Tableau 1 : AGS linéaires de 1 à 32 atomes de carbone	5
Tableau 2. Acide gras mono- insaturée (AGMI) et acide gras polyinsaturée (AGPI)	6
Tableau I.3.3. Valeurs des points de fusion de quelques acides gras	9
Tableau 3 : la teneur (%) et le temps de rétention de la composition chimique d'HV des graines de « <i>cresson alénois</i> » obtenue par macération	17
Tableau 4 : la teneur (%) de quelques composées (flavonoïde, saponine, alcaloïde, phénols totaux).	20
Tableau 5 : la teneur (%) de la composition chimique d'huile végétale des graines de <i>cresson alénois</i>	21
Tableau 6 : la composition des acides aminés et les protéines isolé par les graines de cresson alénois	21
Tableau 7 : la composition des acides gras et tocophérole d'HV des graines de « <i>Cresson Alénois</i> »	22
Tableau 8 : évaluation de l'activité antimicrobienne par des extraits des graines	25
Tableau 9 : Caractéristiques des souches bactériennes testées	35
Tableau 10 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches	37
Tableau 11 : variation de rendement en fonction de la masse végétale	69
Tableau 12 : variation du rendement en fonction du temps d'extraction avec et sans broyage...	41
Tableau 13 : variation du rendement en fonction de temps d'incubation avec prétraitement enzymatique	69
Tableau 14 : variation de rendement en fonction de la concentration de l'enzyme	69
Tableau 15: rendement en huile végétale de l'espèce sans broyage traitée par l'enzyme	44
Tableau 16 : Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de cresson alénois	44
Tableau 17 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de cresson alénois	45

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois extraite par soxhlet sans prétraitement	47
Tableau 19 : les composée par CG-MS des deux huile de prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase)	49
Tableau 20 : le diamètre d'inhibition des souches bactériennes	50
Tableau 21 : Résultats de la lecture des DO et de l'inhibition de radical libre DPPH	53
Tableau 22 : Valeurs EC50 des huiles végétales (huile, cellulase et pectinase) et standard vit E	54

SOMMAIRE

Alimentaire
Nomenclature

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Chapitre I : généralité sur les Acide Gras

I.1.Introduction.....3

I.2. La Composition chimique des Acides Gras.....3

I.3. Les Acides gras.....4

I.3.1 classification des Acides gras.....4

I.3.1.a Acides Gras Volatils.....4

I.3.1.b. Acides Gras Saturés..... 4

I.3.1.c. Acides Gras Mono- Insaturés et Polyinsaturés.....6

I.3.2.propriétés physiques des Acides Gras.....7

I.3.2.1. Densité.....7

I.3.2.2.solubilités7

I.3.2.3 Point de fusion8

I.3.3. Autre Propriétés des Acides Gras.....9

I.4.Les méthodes d'extraction des Acides Gras9

I.5 Extraction par Soxhlet.....11

I.6.Identification des Acides Gras.....12

Chapitre II : synthèse bibliographique sur l'espèce lépidium

II.1.Introduction13

II.2. Classification botanique.....13

II.2 Nom vernaculaire.....	14
II.3. Description botanique	14
II.4. Distribution géographique et écologique de « <i>Cresson Alénois L</i> »...16	
II.5 Composition Chimique de « <i>Cresson Alénois</i> »... ..16	
II.6 Quelques travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce « <i>Cresson Alénois</i> » 17	
II.6.1.Etude de la composition chimique d'huile végétale des graines de « <i>Cresson Alénois</i> » 17.	
II.6.2. Activités biologiques des huiles végétales des graines de « <i>Cresson Alénois</i> »	25.
II.7. Usage médicinale de <i>Lépidium sativum</i> (<i>Cresson Alénois</i>)... ..26	
Chapitre III : Matériel et Méthodes	
III.1.Introduction.....	27
III.2. Matériel.....	27
III.2.1. Matière végétale.....	27
III.2.3. réactifs.....	27
III.3. Extraction par soxhlet	28
III.3.1. Appareillage.....	29
III.3.2. Protocole expérimental d'extraction de l'huile végétale.....	29
III.4. Prétraitement enzymatique	30
II.4.1 Mode opératoire.....	30
III.5.Mesure du taux d'humidité.....	31
III.6.Calcul du rendement de l'huile végétale.....	31
III.7.Détermination des propriétés physico-chimiques de l'huile végétale de « cresson alénois ».....	31
III.8.1 Mesure des indices physiques.....	66
III.8.1.1. Détermination de la densité.....	66

III.8.1.2.Détermination du pouvoir rotatoire.....	66
III.8.1.3.Détermination de l'indice de réfraction.....	67
III.8.1.4.5. Détermination de l'indice d'ester.....	68
III.8.Analyse des acides gras	32
III.8.1. Analyse des acides gras libres.....	32
III.8.2. Analyse des diènes conjugués par spectrophotométrie UV-Vib.....	32
III.8.3.Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).....	33
III.8.3.1. Préparation des dérivés esters méthyliques d'acides gras.....	3
III.8.3.2.Condition opératoire	33
III.9. Activités biologiques.....	34
III.9.1. Etude de l'activité antibactérienne d'HV des graines de « <i>cresson alénois</i> ».....	34
III.9.1.2. Technique en milieu solide	35
III.9.1.2.1. Méthode des aromatogrammes.....	35
III.9.1.2.2. Milieux de culture.....	36
III.9.1.3. Protocole expérimental.....	36
III.10. Activité antioxydante.....	37
III.10.1. Les antioxydants.....	37
III.10.1.1.Les antioxydants endogènes.....	38
III.10.1.2.Les antioxydants exogènes.....	38
III.10.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	38
III.10.2.1.Principe.....	38
III.10.2.2.Mode opératoire.....	38
III.10.2.3.Expression des résultats.....	38

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV. Extraction de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois par soxhlet..	40
IV.1. Effet de la masse des graines et du temps d'extraction sur le rendement en huile végétale avec et sans broyage et sans prétraitement enzymatique	40
IV.1.1.Effet de la masse	40
IV.1. 2. Effet du temps d'extraction.....	41
IV.2. Prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase).....	41
IV.2.1. Optimisation du temps d'incubation.....	42

IV.2.2. Optimisation de la concentration de l'enzyme.....	42
IV.3. Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois.....	44
IV.4. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois.....	45
IV.5. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée la spectrométrie de masse (CG-MS).....	46
IV.6. Activités biologiques.....	50
IV.6.1. Evaluation de l'Activité antibactérienne	50
IV.7. Activité antioxydant.....	52
IV.8. Détermination de la valeur EC50	54
Conclusion	56
Références bibliographiques.....	57
Annexes 1	66
Annexes 2.....	69
Annexes 3.....	71

Introduction Générale

Introduction générale

Pendant de longues périodes, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine. Malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique, environ 80 % de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes, reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres [1]. Aussi, les plantes médicinales ont été utilisées dans de nombreux autres domaines y compris la nutrition, l'assaisonnement, les boissons, les teintures et les cosmétiques. L'effet conservateur de plusieurs plantes aromatiques (épices, condiments) suggère la présence de constituants antioxydants et antimicrobiens [2].

En effet, les plantes possèdent plusieurs substances actives dans leurs divers organes et permettent l'isolation de leurs principes actifs par des techniques chimiques en vue de leur utilisation en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent plus efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés [3].

Les huiles végétales possèdent bien des vertus thérapeutiques et cosmétiques incontestablement reconnues et utilisées depuis la plus haute antiquité. La reconnaissance de ces huiles végétales pour une grande partie est due, en premier lieu à l'avancée des découvertes de nouveaux principes actifs dans la médecine et sur l'importance et l'utilité des acides gras pour notre santé, notamment en ce qui concerne les fameux « oméga 3, 6 et 9 ». Elles sont connues pour la plupart de ce que l'on appelle communément les oléagineux [4].

Dans les opérations de séparation de composés naturels, l'extraction par solvant reste le procédé le plus largement employé et qui semble être appelé à se maintenir, voir se renforcer. Pourtant, la structure interstitielle et la nature des parois et des membranes cellulaires des végétaux présentent souvent la principale résistance au transfert de matière qui intervient lors de l'extraction. La diffusion du solvant et du soluté dans le solvant à travers la structure végétale est entravée par cette structure pour devenir le procédé limitant de l'ensemble de l'opération.

Actuellement et au cours des 50 dernières années des méthodes non-conventionnelles ont été développés pour améliorer le rendement global et la sélectivité des composants bioactifs à

partir de la matière végétale sans modification des caractéristiques qualitatives des molécules bioactives, c'est la méthode du prétraitement enzymatique [5,6]. Les enzymes ont été utilisées notamment pour le traitement de la matière végétale préalablement à des procédés classiques d'extraction [7]. Ce sont des catalyseurs idéals pour aider à l'extraction, la modification ou la synthèse de complexes composés bioactifs d'origine naturelle. La réaction des enzymes (cellulase, pectinase) est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, on trouve le genre *Lépidium*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions tempérées et froides, de nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Lépidium Sativum* L. Cette espèce est largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les inflammations, les brûlures, la diarrhée, la toux, de l'asthme, des maux de ventre, de la stérilité ...etc [8].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressé à étudier l'espèce *Lépidium Sativum* L, dans le but de faire une extraction de l'huile végétale par Soxhlet et l'approche des conditions optimales ainsi que la caractérisation de l'huile grâce à la détermination de sa composition chimique. Dans ce travail, nous allons aussi étudier l'effet du prétraitement enzymatique de la matière végétale et son impact sur le rendement, sur la composition chimique ainsi que sur l'activité antibactérienne et antioxydante de l'huile végétale des graines de cresson alénois extraite par le procédé d'extraction par Soxhlet.

Ce manuscrit est composé de deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, on présentera des généralités sur les acides gras et la matière végétale, son utilisation et les travaux dont elle a fait l'objet.
- La deuxième partie sera consacrée aux matériels et méthodes utilisés lors de cette étude. A partir de l'interprétation et des discussions des résultats expérimentaux, nous terminerons par une conclusion générale sur les différents travaux réalisés et les perspectives des actions à mener.

I-Introduction

Les matières grasses constituent une part importante de l'alimentation et peuvent avoir différentes origines : animale ou végétale. La définition des lipides n'a pas encore été clairement définie en particulier à cause de sa composition très variée (mélange complexe de glycérides, d'acide gras libres, stérols, tocophérols, alcaloïdes...) qui lui confère son goût, sa texture et son odeur à la fois caractéristique et particulière en fonction de sa provenance [9]. Il semblerait que les matières grasses soient une sous-classe des lipides et que ce terme regroupe l'ensemble des acides gras isolés dans un extrait lipidique [10]. Les triglycérides sont composés d'une molécule de glycérol et de trois acides gras dont la structure carbonée peut différer selon la provenance ou l'activité des matières grasses. Il apparaît très clairement dans la littérature que ces composés, fournis par l'alimentation, peuvent jouer un rôle essentiel dans l'organisme afin de fournir l'énergie quotidienne. Ces molécules sont également douées de propriétés indispensables au bon fonctionnement de certains mécanismes biologiques comme le transport des hormones, le transport des vitamines ou l'intégrité des cellules membranaires [11,12]. L'intérêt apporté aux matières grasses est aujourd'hui grandissant, en particulier grâce à la demande des consommateurs et des autorités sanitaires qui requièrent un meilleur contrôle des quantités et de la qualité de ces composés potentiellement absorbés dans l'alimentation. Les propriétés diététiques et nutritionnelles de ces composés, ainsi que leurs implications sur la santé, de plus en plus contrôlées nécessitent aujourd'hui des méthodes d'analyses rapides et efficaces. Cependant, les lipides ne sont pas des composés commodes à analyser en particulier à cause de la différence de polarité, de la complexité et de la multiplicité des molécules qui les composent [13].

I.2. Composition chimique des acides gras

Les lipides sont des produits naturels largement répandus dans le règne animal et végétal. Ils forment une famille hétérogène au point de vue de la structure ou des groupements fonctionnels mais possèdent des propriétés communes concernant leur densité (inférieure à celle de l'eau) et leur solubilité. Peu polaires, les lipides sont généralement insolubles dans les solvants polaires (comme l'eau) mais très solubles dans les solvants non polaires ou faiblement polaires (comme l'éther, le chloroforme, l'acétone, l'hexane, etc.).

Les lipides développent une large gamme de propriétés fonctionnelles :

- Réserve énergétique (triglycérides),
- Transport de molécules liposolubles (vitamines, colorants),

- Molécules structurales (élaboration des membranes cellulaires),
- Régulateurs métaboliques (hormones stéroïdes), émulsifiants, texture.

Les lipides comprennent deux principaux types : lipides simples et lipides complexes, qui diffèrent par leur composition atomique. Les acides gras appartiennent à la classe des « lipides simples », molécules hydrophobiques très importantes aux fonctions multiples dans la cellule [14].

I.3. Les Acides Gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe ou sans instauration (figure 1). Il s'agit des acides organiques faibles qui ne possèdent qu'une seule fonction acide par molécule (COOH) et sont formés d'un nombre de carbone presque toujours pair, généralement compris entre 4 et 30 ou entre 4 et 36. [15,16]

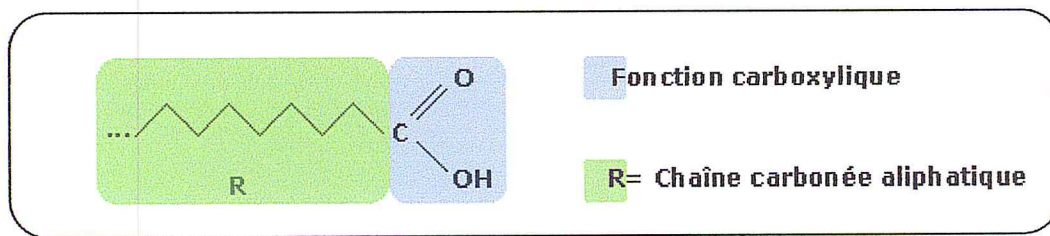


Figure 1 : Acide gras

L'autre extrémité de la chaîne se termine par un groupement méthyle CH_3 . Ils représentent 90 à 96% de la masse molaire des triacylglycérols (triglycérides).

Les acides gras existent rarement à l'état libre dans la cellule, mais le plus souvent ils sont liés à un alcool pour former un lipide [16]. Les différents acides gras se différencient d'une part, par le nombre de carbones et d'autre part, par le niveau d'instauration [17].

I.3.1 classification des acides gras

I.3.1.a Acides Gras Volatils

Ce sont des acides particuliers car ils sont très courts (2 à 4 carbones). De ce fait, ils passent facilement à l'état gazeux, d'où leur nom générique. Cette singularité est encore renforcée par leur hydro solubilité.

I.3.1.b. Acides Gras Saturés

Ce sont des acides gras ayant des atomes de carbone totalement saturés en hydrogène (les chaînes ne présentent pas de double liaison) (tableau 1). Les acides gras saturés augmentent la cholestérolémie.

Les acides gras saturés les plus fréquents sont : l'acide laurique (C12:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide arachidique (C20:0), etc.

Tableau 1 : AGS linéaires de 1 à 32 atomes de carbone

n ₃	Nom usuel	Nom IUPAC	Cx:y ₄	Formule chimique
4	acide butyrique	acide butanoïque	C4:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂ -COOH
5	acide valérique	acide pentanoïque	C5:0	H ₃ C-(CH ₂) ₃ -COOH
6	acide caproïque	acide hexanoïque	C6:0	H ₃ C-(CH ₂) ₄ -COOH
7	acide énanthique	acide heptanoïque	C7:0	H ₃ C-(CH ₂) ₅ -COOH
8	acide caprylique	acide octanoïque	C8:0	H ₃ C-(CH ₂) ₆ -COOH
9	acide pélargonique	acide nonanoïque	C9:0	H ₃ C-(CH ₂) ₇ -COOH
10	acide caprique	acide décanoïque	C10:0	H ₃ C-(CH ₂) ₈ -COOH
11	acide undécyclique	acide undécanoïque	C11:0	H ₃ C-(CH ₂) ₉ -COOH
12	acide laurique	acide dodécanoïque	C12:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₀ -COOH
13	acide tridécyclique	acide tridécanoïque	C13:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₁ -COOH
14	acide myristique	acide tétradécanoïque	C14:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₂ -COOH
15	acide pentadécyclique	acide pentadécanoïque	C15:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₃ -COOH
16	acide palmitique	acide hexadécanoïque	C16:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₄ -COOH
17	acide margarique	acide heptadécanoïque	C17:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₅ -COOH
18	acide stéarique	acide octodécanoïque	C18:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₆ -COOH
19	acide nonadécyclique	acide nonadécanoïque	C19:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₇ -COOH
20	acide arachidique	acide eicosanoïque	C20:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₈ -COOH
21		acide hénéicosanoïque	C21:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₉ -COOH
22	acide béhénique	acide docosanoïque	C22:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₀ -COOH
23		acide tricosanoïque	C23:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₁ -COOH
24	acide lignocérique	acide tétracosanoïque	C24:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₂ -COOH
25		acide pentacosanoïque	C25:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₃ -COOH
26	acide cérotique	acide hexacosanoïque	C26:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₄ -COOH
27		acide heptacosanoïque	C27:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₅ -COOH
28	acide montanique	acide octacosanoïque	C28:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₆ -COOH
29		acide nonacosanoïque	C29:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₇ -COOH

30	acide mélissique	acide triacontanoïque	C30:0	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{28}-\text{COOH}$
31		acide hentriacontanoïque	C31:0	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{29}-\text{COOH}$
32	acide lacéroïque	acide dotriacontanoïque	C32:0	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{30}-\text{COOH}$

3 n : indique le nombre d'atomes de carbone

Y : indique le nombre de double liaison C—C

I.3.1.c. Acides Gras Mono- Insaturés et Polyinsaturés

Ce sont des acides gras qui comportent une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone au niveau de la chaîne carbonée. L'acide gras est qualifié de mono-insaturé lorsqu'il n'y a qu'une seule double liaison carbone-carbone et de polyinsaturé lorsqu'il y en a plusieurs. Les plus fréquemment rencontrés sont l'acide palmitoléique (C16:1) dans certaines graisses animales, l'acide oléique (C18:1) très abondant dans les huiles végétales, l'acide linoléique (C18:2) dans le lin et les huiles végétales, l'acide α -linoléique (C18:3) dans les huiles végétales, l'acide arachidonique (C20:4) dans les viandes, l'acide eicosapentaénoïque (C20:5) dans les graisses de poissons, l'acide docosahexaénoïque (C22:6), etc..... Le tableau 2 regroupe les différentes composées des acides gras insaturés.

Tableau 2. Acide Gras Mono- Insaturée (AGMI) et Acide Gras Poly-Insaturée (AGPI)

Nom usuel	Nom IUPAC	Cx:y ω - is	Formule chimique
acide palmitoléique	acide hexadécène-9-oïque	C16:1 ω -7	$\begin{array}{c} \text{HC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\ \\ \text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$
acide oléique	acide octadécène-9-oïque	C18:1 ω -9	$\begin{array}{c} \text{HC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\ \\ \text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$
acide érucique	acide docoscène-13-oïque	C22:1 ω -9	$\begin{array}{c} \text{HC}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH} \\ \\ \text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$
acide linoléique	acide octadécadiène-9,12-oïque	C18:2 ω -6	$\begin{array}{c} \text{HC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3 \end{array}$

acide linoléique	acide octadécatriène- 9,12,15-oïque	C18:3 ω -3	$\begin{array}{c} \text{HC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$
------------------	---	-------------------	---

ω - i : indique que la 1ère insaturation est située sur l'atome de carbone i en comptant depuis l'atome de carbone opposé de celui de la fonction acide $-\text{COOH}$

Le nom des acides gras insaturés sont suivis généralement des termes *cis* et *trans* (Figure 2.), qui désignent la façon dont s'organisent dans l'espace les doubles liaisons et les atomes d'hydrogène ainsi que les ramifications.

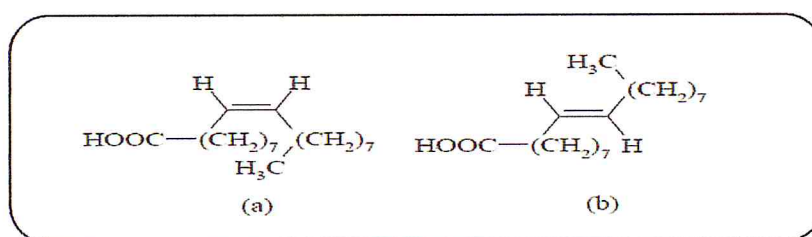


Figure 2 : acide *cis* (a) et *trans* (b) oléique

L'orientation *cis* ou *trans* va ainsi modifier la structure tridimensionnelle des acides gras. Une double liaison *cis* va créer un coude dans la chaîne hydrocarbonée tandis qu'une double liaison *trans* va créer une structure étendue. Dans la nature, les acides gras ont très majoritairement une orientation *cis* plutôt que *trans*, qui est génératrice d'une certaine toxicité.

I.3.2. propriétés physiques des acides gras

I.3.2.1. Densité

Les acides gras ont une densité inférieure à celle de l'eau (densité de référence), ce qui explique pourquoi l'huile remonte à la surface de l'eau (ou de vinaigre) quand l'émulsion n'est pas stabilisée.

I.3.2.2. solubilités

Les Acides Gras étant bipolaires (c'est-à-dire qu'ils présentent un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe), le comportement global de la molécule dépend de la taille de la chaîne aliphatique. Si elle est petite c'est le comportement hydrophile qui l'emporte : la molécule est

donc soluble en milieu aqueux, c'est le cas des acides gras courts (ayant moins de 6 carbones). Cela concerne également les acides gras dits à chaîne moyenne (6 à 10 carbones).

A partir de 12 carbones l'acide gras est considéré comme long et devient totalement insoluble en milieu aqueux [14].

Les acides gras sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (éther éthylique, essence, tétrachlorure de carbone, trichloréthylène, chloroforme, hexane, etc.) [18].

I.3.2.3 Point de fusion

Le point de fusion est la température à laquelle l'acide gras change d'état, c'est-à-dire passe de l'état solide à l'état liquide. Il est difficile à saisir car les corps gras passent par un état pâteux avant d'être liquides. Le point de fusion des lipides va se confondre généralement avec celui de ou des acides gras constituant le lipide. Pour une forme donnée, la température de fusion s'élève avec la longueur de la chaîne carbonée.

L'augmentation est de l'ordre de 6,5 °C à 9,5 °C pour un accroissement de 2 atomes de carbone [15]. Pour une longueur de chaîne donnée, la température de fusion diminue avec le nombre de double liaison (le degré d'insaturation). L'abaissement est plus grand pour les « isomères-cis » par rapport aux « isomères-trans ». Le positionnement de la ou des doubles liaisons influence le point de fusion, il est aussi plus grande lorsque la double liaison se trouve au milieu de la chaîne (ou proche de cette position). Les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone présentent des températures de fusion inférieures aux acides gras à nombre pair d'atomes de carbone.

Tableau I.3.3. Valeurs des points de fusion de quelques acides gras [14].

Nature de l'acide gras saturé	Point de fusion (°C)	Nature de l'acide gras insaturé	Point de fusion (°C)
C4 : 0	-6.5	C18:1 Δ9c	16.3
C6 : 0	-3	C18:1 Δ9c	45
C8 : 0	16-17	C18:2 Δ 9c, 12c	-5
C10 : 0	31.5	C18:2 Δ10c, 12c	56-57
C12 : 0	44.3	C18:3 Δ9c, 12c, 15c	-11
C14 : 0	53.9	C22:1 Δ13c	33-34
C16 : 0	63.1	C22:1 Δ13c	61.5
C18 : 0	70	C24:4 Δ 5c, 8c, 11c, 14c	-49.5
C20 : 0	76.5	C24:0	86

I.3.3. Autre Propriétés des acides gras [19]

- Les acides gras insaturés rancissent (malodorants) en présence d'air (peroxydation suivi quelques fois de polymérisation);
- A température ordinaire, les acides gras sont des liquides si leur chaîne carbonée compte moins de 10 atomes de carbone. Ils sont solides lorsqu'ils sont insaturés, ils absorbent dans l'ultraviolet ce qui permet leur dosage.
- L'estérification des acides gras permet de préparer des esters plus volatils et plus simples à analyser par CPG. (chromatographie en phase gazeuse)
- L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années, les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries gram⁺ et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration et du PH du milieu.

I.4. Les méthodes d'extraction des acides gras

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour extraire des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes drogues ou parfums. L'extraction par solvant fait généralement appel, dans le cas des produits végétaux, à l'eau, aux alcools, aux solvants chlorés et/ou organiques dont l'hexane ou le mélange chloroforme-méthanol [20].

De nombreuses autres méthodes d'extraction sont spécifiquement utilisées dans le cas des lipides des matières végétales. On en cite, en tout premier lieu le pressage à plaque ou à vis. D'autre méthode d'extraction telles que : L'extraction par Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes et/ou ultra-son, l'extraction par fluide supercritique, etc. doivent également être considérées comme des opérations d'extraction par solvant.

Dans le cas de processus d'extraction par solvant et de séparation de l'huile (ou de molécules spécifiques) présentes dans un milieu solide, l'opération fait souvent appel d'un point de vue technologique à la diffusion au sein du solide d'un fluide (liquide) porteur appelé solvant d'extraction, l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide –liquide.

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles. Ces techniques sont les suivantes :

- **La percolation** : consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solides finement divisés. La préparation du café relève de cette opération [21].
- **La décoction** : est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable [21].
- **L'infusion** : est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition suivi du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération [21,22].
- **La macération** : est une infusion dans un solvant à froid. L'opération bien que généralement longue est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace une macération peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et dans certains cas maintenue dans un réfrigérateur [21,22]

- **La digestion** : est une macération à chaud. La digestion et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. La digestion d'une opération plus rapide que la précédente, ne posant généralement aucun problème de conservation ni de contamination bactérienne [21,22]

I.5 Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet utilisée pendant longtemps, est une technique standard et de référence principale pour évaluer la performance des autres méthodes d'extraction solide-liquide. La conception de cette technique d'extraction a été décrite pour la première fois par Franz von Soxhlet en 1879 pour la détermination de la teneur lipidique du lait [23].

L'extraction par Soxhlet est une technique générale bien établie qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles [24].

L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules car la diffusion interne est souvent l'étape limitante pendant l'extraction.

Les avantages de l'extraction par Soxhlet sont :

- le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller,
- le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide.
- aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché

Cependant, cette méthode présente des inconvénients tels que :

- le temps d'extraction est long,
- une grande quantité de solvant est nécessaire,
- il est impossible d'accélérer le processus par agitation,
- la grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation/ concentration
- la possibilité de dégradation thermique des composés cibles ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long.
- la grande quantité de solvant ainsi que la longue durée de l'opération ont conduit à de larges critiques de cette méthode.

L'extraction par Soxhlet est une technique généralement bien établie. Les diverses applications, la bonne reproductibilité, l'efficacité et l'aisance avec laquelle les extraits sont manipulés, sont les avantages spécifiques de l'extraction par cette technique; la simplicité de l'équipement nécessaire à cette méthode lui permet de se maintenir par rapport aux nouvelles techniques telles que les extractions assistées par ultrasons, assistées par micro-ondes et par fluide supercritique.

I.6. Identification des acides gras [25]

- Détermination de la composition en acides gras : réalisée par CPG sur les esters méthyliques (obtenus par méthylation)
- Chromatographie sur Couche Mince (CCM), on compare les acides gras issus de la saponification de l'huile à examiner à ceux obtenus par la saponification d'un mélange d'huile
- Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée par Spectrométrie de Masse (CG/SM)

II.1.Introduction :

La famille des Crucifères ou Brassicacées est connue depuis longtemps, comme étant la famille de la moutarde, c'est une famille très importante qui se compose de 13 à 19 tribus, répartie en 350 genres et plus de 3500 espèces [26,27]. Elle se trouve surtout dans les régions tempérées et froides [28]. Ce sont principalement des plantes variables: annuelles, bisannuelles ou vivaces [29]. Parmi ce genre, «*Cresson Alénois* » une plante médicinale de la famille des Brassicacées [26].

II.2. Classification botanique

Au cours des 200 ans, le système Linnaeus a été introduit et généralement adopté pour la classification botanique de «*lépiduim sativum L*». Par la suite, d'autres améliorations et affinités ont été ajoutées à cette classification pour une classification systématique commune [30].

D'après Linné [30] et Lawrence [31], l'espèce «*Cresson Alénois* » est classé dans :

Règne : Plante

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Angiospermas

Classe : Dicotylédones

Sous – classe : Polypetalae

Ordre : Prietales

Familles : Crucifères ou Brassicacées

Genre : Lépidium

Espèce : Lépidium Sativum L



Figure 3 : Lépidium Sativum L

II.2 Nom vernaculaire

Le nom populaire de « *lépidium sativum L* » est « *Cresson Alénois* » mais aussi est connue par « *Passerage Cultivée* », et « *Cressonnette* », nom proclamant L'ancienne utilisation comme antidote de la rage.

Le mot « *cresson* » est apparu dans la langue française en 1130. Il vient du francique « *kresso* » qui signifie « rampant », et aussi « *sativum* » qui signifie « cultivé ». Ce nom commun se retrouvait dans plusieurs langues Par exemple : « *Garden Cress* » en Grande Bretagne ou « *Berro de Huerta* ou *Mastuerzo* » en Espagnol « *Agrião* et *Mastruco* » en portugais, « *Gartenkresse* » en Germanie « *Agretto* ou *Cressione* » en italien, « *Chandrasoor* » en inde et « *hab Rhashad* » ou « *Elhorf* » En Arabe [32]

II.3. Description botanique :

« *Cresson Alénois* » est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, la forme cultivée pousse dans les régions tempérées du monde entier. C'est un arbuste subtropical mais aussi dans les massifs montagneux tropicaux pouvant atteindre 20 à 80 cm de haut. Les pétales sont de couleur blanche et parfois rose pâle. « *Cresson Alénois* » présente une période de floraison allant du mois de Juin Jusqu'au mois d'Août, poussant dans des sols riches en base et légèrement acide [33].

Ses tiges sont droites, de formes rondes, lisses et solides, un peu rameuses.



Figure 4 : les tiges de *Cresson Alénois*

Les feuilles sont entières ou pennées, disséquées diversement lobées, souvent avec des segments linéaires jusqu'à 5-6 cm de longueur et la taille des lobes est de 0,7 à 1,2 cm ou de 0,3 à 0,6 cm



Figure 5 : les feuilles de *Cresson Alénois*

Les fleurs sont petites de couleur blanche ou rose pâle, elles sont en grappes droites corolles blanches, elles forment quatre folioles ovales et concaves, elles sont pédicelles de 3 à 5 mm de longueur.



Figure 6 : les fleurs de *Cresson Alénois*

Les fruits sont silicules orbiculaires, comprimés échancrés au sommet, ils sont ovoïdes terminés en pointe.

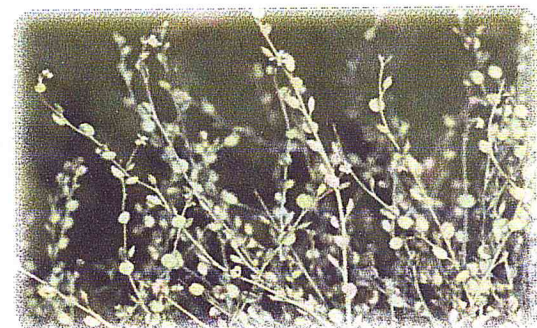


Figure 7 : Les fruits de *Cresson Alénois*

Les graines sont petites, de forme ovales et triangulaires à une extrémité, lisses environ 2 à 3 mm de long et de 1 à 1,5 mm de large, de couleur brunes à rouges.

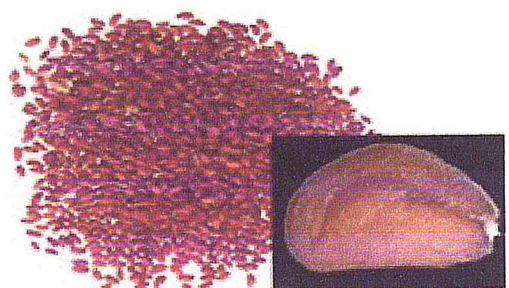


Figure 8 : les grains de cresson alénois

II.4. Distribution géographique et écologique de « *Cresson Alénois* L ».

C'est une plante originaire de Perse, des pays méditerranéens (Maroc, Tunisie et l'Algérie) et d'Asie (majoritairement en Inde, plus fréquentes en Pakistan et dans d'autres pays tel que : Egypte, Arabie saoudite, etc...). Elle est cultivée dans toute l'Europe, elle pousse mieux sur les limons humides. Les graines de « *Cresson alénois* » peuvent être cultivées à n'importe quelle altitude et toute l'année, mais dans les régions tropicales, elles poussent mieux pendant la saison froide. Elles résistent assez bien à la sécheresse. En Afrique tropicale, cette espèce est cultivée à 750–2900 m d'altitude, mais il préfère les conditions froides à 2400 m d'altitude environ. Cette espèce se rencontre au niveau des forêts, on la trouve aussi dans les prairies montagneuses, les rocaillies et les terrains salés [29,34].

II.5 Composition Chimique de « *Cresson Alénois* »

« *Cresson Alénois* » comprend plusieurs composés biologiquement actifs tels que : les flavonoïdes, les alcaloïdes (alcaloïde imidazolique), les stérols, les triterpènes, les glucosinolates, les caroténoïdes, les acides gras, les vitamines (en particulier la provitamine A (acide ascorbique) et des vitamines C, B1, B2), les protéines, les carbohydrates et les composés minéraux tels que (K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn) [35,36,37,38,39]

La composition chimique des feuilles contient les protéines, les acides gras, les carbohydrates, les composés minéraux tels que le calcium et le phosphore et des traces d'éléments tel que (nickel, cobalt et iode). Les feuilles contiennent des vitamines tel que le provitamine A, thiamine, riboflavine, niacine et elles possèdent trois flavonols glycosides qui sont quercetin-3-O-glucosyl(1→2)-glucopyranoside-7-O-glucopyranoside, kaempferol-3-O-glucosyl(1→2)-glucopyranoside-7-O-glucopyranoside et isorhamnetin-3-O-sophoroside-7-O-Dglucopyranoside [40]. Aussi, on trouve la présence du carotène [41]

La composition chimique de la partie aérienne contient : 4-méthoxyglucobrassicin, B-sitosterol, benzylcyanide, l'acide p-coumarique, l'acide quinique, les protéines, les vitamines, les composés minéraux et les flavones tel que : 5-4-dihydroxy-7,8,3',5-tétraméthoxyflavone, 5-3'-dihydroxy-7,8,4-triméthoxyflavone, 5-3'-dihydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone [40]. Quatre glucosinolates qui sont glucotropaeolin, gluconain, gluconasturtin et glucobrassicinapin et trois nouveaux phytoconstituants qui sont Lepidium séstentéréol, lepidium térpenoïde et lepidium térpenylester [41]

- La composition chimique des graines de « *Cresson Alénois* » contient : les protéines, les carbohydrates les alcaloïdes (alcaloïde imidasolique), les acide gras tel que l'acide linolénique , linoléique , palmitique , érucique , stéarique , arachidique , béhenique , lignocérique , benzyle isothiocyanate , benzyle cyanide. Elle contient également les stérols, les sitostérols, les caroténoïdes e le tocophérol [42, 43,44].

II.6 Quelques travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce « *Cresson Alénois* » :

Différents travaux de recherche ont été menés sur « *Cresson Alénois* » dont parmi eux sont :

II.6.1. Etude de la composition chimique d'huile végétale des graines de « *Cresson Alénois* »

- En 1979, Gil et coll [43] ont étudié la composition chimique d'huile végétale (HV) des graines de « *Cresson Alénois* » par macération dans l'Hexane L'identification par CG-MS de la composition chimique d'HV est représentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : la teneur (%) et le temps de rétention de la composition chimique d'HV des graines de « *cresson alénois* » obtenue par macération

Composée	Temps de rétention (min)	La teneur(%)
Acétone	2.2	8
A xylène	7.8	Tr
A xylène	8.3	Tr
2 methylbutan-2-ol	8.5	3
An éthyltoluène	9.5	Tr
Pentan-1-ol	10	3
Styrène	10.2	Tr
Isobutylbenzène	10.5	Tr
An éthyltoluène	10.8	1
A C4 substitution benzène	11	Tr

2- ethylhexanol	11.5	4
Allyl isothiocyanate	11.9	3
Benzaldéhyde	12.5	7
Pentylbenzène	12.8	Tr
Benzoate de méthyle	13.5	Tr
Benzylmethylesulphide	14	Tr
Phenylméthanthiol		
Benzyl mercaptan	14.3	Tr
Benzylalcool	16.9	4
Phenylacétonitril		
Benzyl cyanide	18	53
Benzylisothiocyante	22.0	7
3 phenylpropionitril		
2- phenylcyanide	22.5	Tr
Benzylthiocyanate	24.0	ND

- En 1998, Ulrich et coll [44] ont réalisé l'étude chimique de l'extrait acétate d'éthyle des graines de *lépidium sativum*. Dix alcaloïdes imidazoliques de la famille Lépidine, dont six dimériques ont été isolé : Lépidine A, B, C, D, E et F (1 à 6) et quatre monomériques , Semilépidine A et B (7 et 8) et Semilépinoside A et B (9 et 10)

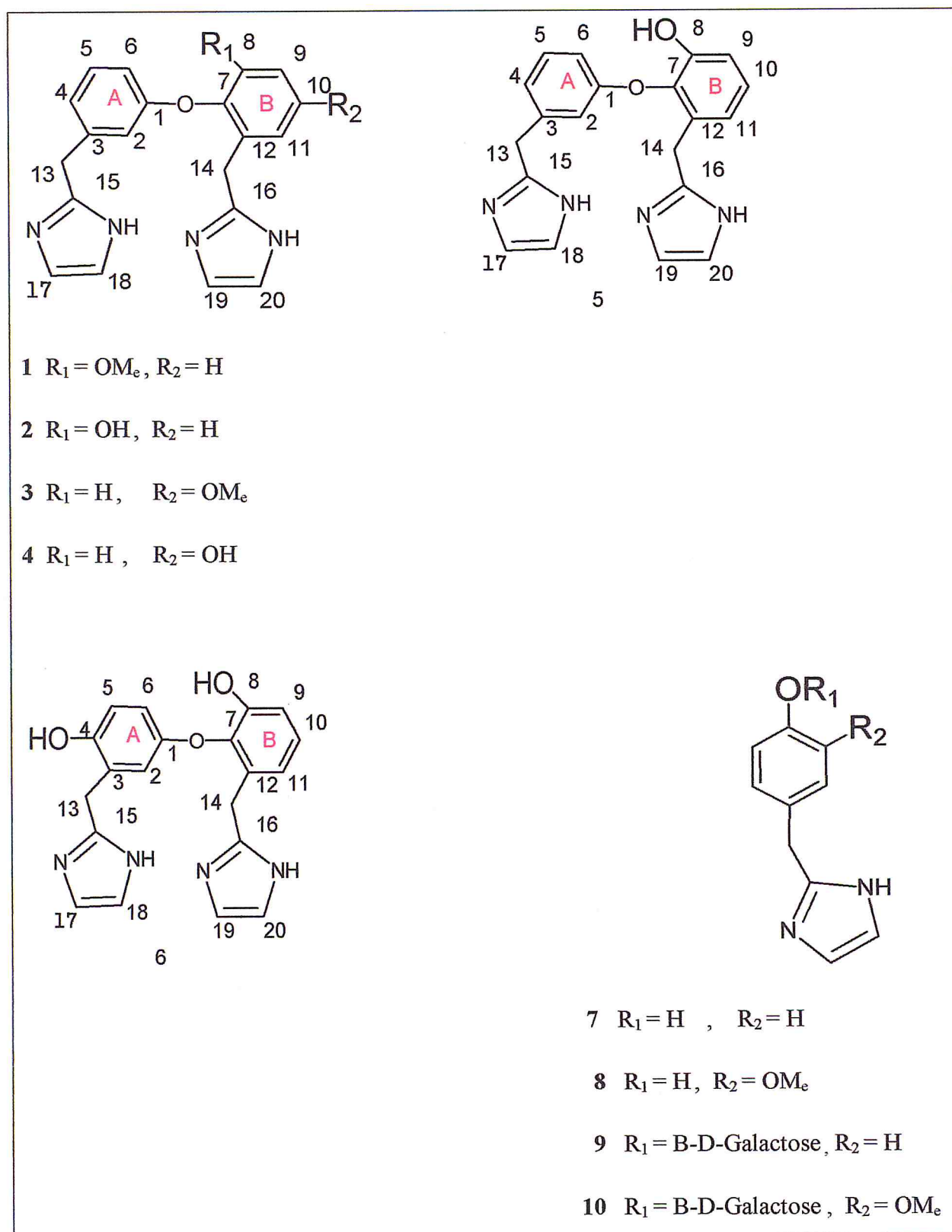


Figure 9 : les molécules des dix alcaloïdes imidazoliques

- En 1998, Harbone [45] et en 2000, Kokate [46] ont effectuée un screening phytochimique par différents solvants (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol et l'eau). Les résultats ont montré la présence des alcaloïdes, des acides aminées, des carbohydrates, des glycoside, inuline, mucilage, tannin, saponine, stéroïde, triterpenoid et flavonoïdes. d'autre part la quantité d'estimation d'HV des graines de « *Cresson Alénois* » Le tableau 4 regroupe les différents composés chimiques avec leurs teneurs.

Tableau 4 : la teneur (%) de quelques composées

Les composées	La teneur (%)
Flavonoïde	2.50
Saponine	2.96
Alcaloïde	0.29
Phénols totaux	0.94

- En 2004, Gokavi et coll. [43] ont étudié la composition chimique de l'extrait des graines de « *Cresson Alénois* » extraite par hexane par la méthode de Soxhlet. L'identification de la composition chimique de l'huile extraite a été réalisée par CG-MS et elle a montré la présence des composés suivants : L'acide linoléique (C18:3; 29.3%), l'acide oléique (C18:1; 30.6%), l'acide linoléique (C18:2; 7.6%), l'acide palmitique (C16:0; 9.4%), et l'acide arachidonique (C20:0; 2.3%) .
- EN 2012, Al-Jasass et coll [47] ont étudié la composition chimique de l'huile végétale des graines de « *Cresson Alénois* » extraite par la méthode de soxhlet. L'identification par CG par détecteur FID a montré la présence de deux principales composées : l'acide lénolinique (48.43%) et l'acide oléique (15.35%). La composition chimique d'huile végétale des graines de *cresson alénois* obtenue par soxhlet est représentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : la teneur (%) de la composition chimique d'huile végétale des graines de « *Cresson Alénois* »

Acides Gras	La teneur
acide myristique C14:0	1.5
acide palmitique C16:0	5.86
acide palmitoléque C16:1	2.02
acide stéarique C18:0	6.56
Acide oléique C18:1 (Cis)	15.35
Acide oléique C18:1 (Trans)	4.05
acide linoléique C18:2	11.79
acide linolénique C18:3	48.43
acide arachidique C20:0	2.79
C20:2	1.6
acide érucique C22:1	ND

En 2013, Rehab Farouk Mohammed Ali [48] a étudié la composition chimique d'HV des graines de « *Cresson Alénois* » où il a montré la présence des composés tels que : les protéines (acide aminés), les acides gras et les tocophérols (tableau 6 et 7).

Tableau 6 : la composition des acides aminés et les protéines isolé par les graines de Cresson Alénois

Les Acides aminées Essential	Les Protéines isolés FAO/WHO/UNU (1985)		Indice chimique	Les Acides aminés Non essential	Les Protéines isolés (g/100 g)
	content (g/100 g) d'Acides Aminés				
Histidine	3.62	1.4	288.5	Arginine	3.64
Isoleucine	4.77	4.00	119.25	Acide Aspartique	5.20
Leucine	6.95	7.04	98.70	Acide Glutamique	12.71

Lysine	6.86	5.44	126.10	Glycine	25.01
Méthionine	0.71	-	-	Proline	5.00
Cystine	0.19	-	-	Serine	4.87
sulfure d'acides aminés totaux	0.90	3.52	25.56	-	4.19
Phénylalanine	5.63	-	-	-	-
Tyrosine	3.01	-	-	-	-
Les Acides aminés aromatiques totaux	8.64	6.80	127.05	-	-
Thréonine	4.62	4.00	115.5	-	-
Valine	6.20	3.5	117.14	-	-
Tryptophane	1.82	0.96	189.58	-	-
Les Acides aminés essential totaux	44.38			Les Acides aminés non essential totaux	55.62

Tableau 7 : la composition des acides gras et tocophérole d'HV des graines de «Cresson Alénois »

Acides gras	La teneur d'HV (%)
C8:0 Acide Caprylique	ND
C10:0 Acide Caprique	ND
C12:0 Acide Laurique	ND
C14:0 Acide Myristique	ND
C16:0 Acide Palmitique	9.10

C16:1 Acide Palmitoleique	0.16
C18:0 Acide Stearique	4.40
C18:1 Acide Oleique	26.42
C18:2 Acide Linoleique	8.64
C18:3 Acide linolenique	41.1
C20:0 Acide Arachidique	3.75
C20:1 Acide Arachidonique	ND
C22:0 Acide Béhenique	ND
C22:1 Acide Erucique	6.56
Acide Gras Saturée (SAFA)	17.07
Acide Gras Monoinsaturée (MUFA)	33.15
Acid Gars Polyinsaturée (PUFA)	49.81
Tocopherols (mg/100 g)	
α - Tocopherol	18.49 $\pm$ 0.86

β - Tocopherol	Not detected
γ - Tocopherol	115.47 $\pm$ 2.79
δ - Tocopherol	16.50 $\pm$ 1.14
Total	150.46

- En 2011, Rehman et coll [49] a identifié et étudié l'effet laxatif des alcaloïdes, des saponines et des anthraquinones.
- En 2014, Prajapati et coll [50] ont étudié les extraits des graines sélectionnés pour diverses activités biologiques comme hypotenseur, antimicrobienne, hypoglycémique et allélopathique, alors que son mucilage tégument a été isolé en utilisant différentes méthodes pour faire excipient efficace sur la fonctionnalité désirée dans le cadre d'applications pharmaceutiques. Grâce à vif références des travaux publiés sur *Lepidium sativum* Linn, dans cette revue, ils avaient mis l'accent sur la méthode d'isolement de mucilage, constituants chimiques, profil pharmacologique et une utilisation polyvalente du *Lepidium sativum* Linn. La formulation de mucilage est représentée dans la figure 10.

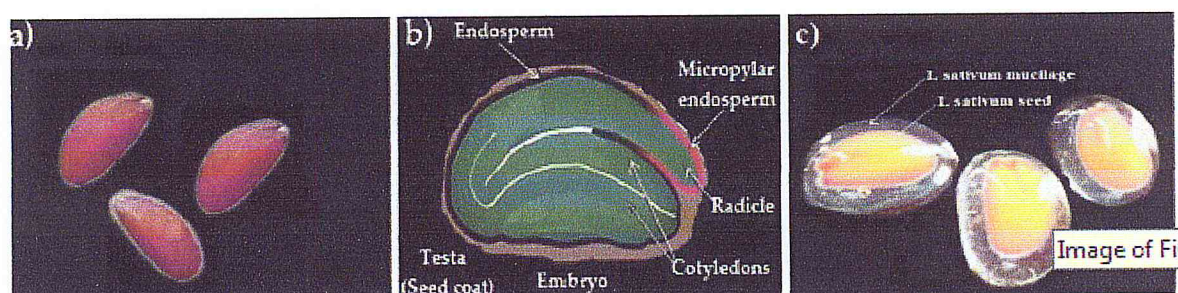


Figure 10 : la formulation de mucilage des graines de Cresson Alénois

II.6.2. Activités biologiques des huiles végétales des graines de « Cresson Alénois »

Les études effectuées sur les huiles végétales des graines de « Cresson Alénois » ont montré qu'elles sont très actives, puisqu'elles manifestent un important potentiel antioxydant [51].

Elles présentent aussi une activité anti-inflammatoire, antipyrétique, et analgésique [52]. Elles possèdent aussi des propriétés tels que : diurétique, anti hypertensive, hypoglycémique et antidiabétique [53, 54, 55,56].

- En 2011, Shama et coll [56] ont étudié l'activité antibactérienne des extraits préparés à partir des graines dans (l'éther de pétrole, méthanol et l'eau), cette étude a également montré une forte activité antimicrobienne contre les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui sont inhibés à des concentrations différentes illustré dans le tableau 8.

Tableau 8 : évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des graines

Organismes	Concentration (%)	Extrait par Ether de pétrole	Extrait par méthanol	Extrait par l'eau
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.5	25	15	-
	5	13	11	-
	10	13	14	18
<i>Escherichia coli</i>	2.5	25	17	10
	5	14	14	12
	10	24	13	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.5	26	16	11
	5	12	15	12
	10	19	11	17
<i>Proteus vulgaris</i>	2.5	21	18	10
	5	13	10	15
	10	17	20	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5	18	17	9
	5	15	12	10
	10	14	10	16
<i>Cadida albicans</i>	2.5	32	9	-
	5	11	-	-

	10	13	19	21
--	----	----	----	----

(-)Pas d'inhibition

II.7. Usage médicinale de *Lépidium sativum* (*Cresson Alénois*) :

La famille des Crucifères (Cruciféracées), appelée actuellement Brassicacées, est une grande famille dispersée dans le monde entier, Les crucifères sont largement utilisées en médecine traditionnelle [57]. « *Cresson Alénois* » est une espèce condimentaire très employée dans la cuisine indienne et en Occident, car elle est appréciée en salade et en garniture accompagnant certains plats. Le cresson est utilisé comme diurétique, stimulant et antiscorbutique. Il est très riche en vitamines, C, E, A, B1 et B2 ainsi qu'en sels minéraux, calcium, cuivre, fer et magnésium. C'est un bon reconstituant, d'où un anti anémique. Les graines en infusion dans du lait chaud ou triturées dans du miel, sont indiquées dans le traitement de la toux, de l'asthme, des maux de ventre, et de la stérilité. Utilisés pour activer l'accouchement et comme réchauffant. Les graines sont utilisées aussi en cas de tuberculose, de syphilis et de rachitisme [58, 59,60],

En usage externe, la farine des graines rentrent dans la composition de cataplasmes révulsifs contre les bronchites ou cicatrisants contre les abcès [61]. Elle est utilisée aussi en médecine traditionnelle pour prévenir l'apparition du cancer du poumon chez les fumeurs, elles protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres, elles préviendraient le développement de maladies cardiovasculaires et d'autre maladie liée au vieillissement. Elle possède un effet préventif contre l'hypertension artérielle. Grâce à son pouvoir antioxydant [51,54], le B- carotène pourrait améliorer certaines fonctions du système immunitaire et serait associé à la prévention du cancer dont ceux du sein et du poumon. Le jus de cresson protégerait également les cellules contre l'apparition du cancer colorectal. Cresson alénois à également des propriétés antidiabétiques, mis à part son activité Anti-inflammatoire [56,52]. Une étude a été effectuée sur cresson alénois a montré que le mucilage des graines germées apaise l'irritation des intestins pendant les épisodes de dysenterie et de diarrhée [62].

Chapitre III

Partie Expérimental

III.1.Introduction

Ce chapitre est consacré à :

- L'extraction de l'huile végétale des graines de cresson alénois avec et sans par soxhlet,
- L'utilisation du prétraitement enzymatique,
- La détermination des propriétés physico chimiques et analyse de la composition chimique par CG/MS de l'huile végétale extraite avec et sans prétraitement enzymatique,
- et enfin l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'huile végétale.

III.2. Matériel

III.2.1. Matière végétale



Figure 11 : les graines de Cresson Alénois utilisé

Cresson Alénois est une épice d'origine Indienne, elle a été achetée dans un magasin se trouvant à Blida. L'identification et la systématique de cette espèce ont été confirmées au niveau du laboratoire botanique du jardin d'essais d'El Hamma (Alger).

III.2.3. Réactifs

Produits	marques	Pureté
Hexane	Sigma-Aldrich	>99%
Cellulase	Sigma-Aldrich	-

Pectinase	Sigma-Aldrich	-
Acide citrique	VWR BDH prolabo, CE	-
KOH	Panreac Quimica , espagne	-
Méthanol	Sigma-Aldrich	>90.50%
DPPH	Fluka	>97%
Vitamine E	Sigma-Aldrich	>99%

III.3. Extraction par Soxhlet

La méthode d'extraction solide-liquide la plus utilisée dans les laboratoires reste néanmoins la méthode de Soxhlet [24, 63,64]. La technique consiste à placer un échantillon solide dans une cartouche de cellulose poreuse. Ce réceptacle est ensuite positionné dans un extracteur de soxhlet muni d'un réfrigérant et d'un ballon de distillation contenant le solvant adapté à l'extraction de l'analyte cible (Fig.12). Son fonctionnement consiste en un lavage itératif de l'échantillon solide par l'intermédiaire de volumes de solvant fraîchement distillés. Les volumes de solvant sont siphonnés régulièrement dans le ballon de distillation créant des cycles de lavage répétés jusqu'à épuisement complet du solide considéré ou jusqu'à obtention d'un pourcentage suffisant d'extrait. Suite à l'évaporation totale du solvant contenu dans le ballon de distillation, l'extrait sec peut être recueilli en vue de son analyse.

L'extraction de l'huile végétale de *lépiduim sativum* L. a été réalisée à l'échelle laboratoire en utilisant le procédé de Soxhlet où nous avons étudié l'influence de certains paramètres sur le rendement en huile végétale. Pour ce faire, nous avons travaillé avec le même lot de cette espèce pour les différents essais.

- Utilisation de la matière avec et sans broyage
- Le temps d'extraction où nous avons réalisé une série d'extraction allant de 1H30min jusqu'à 4 H.
- La masse de la matière végétale : Une série d'extraction a été effectuée en faisant varier la masse de 30g à 150g.

III.3.1. Appareillage

L'extraction d'huile végétale des graines de cresson alénois par soxhlet en utilisant le dispositif expérimental schématisé dans la figure 12.

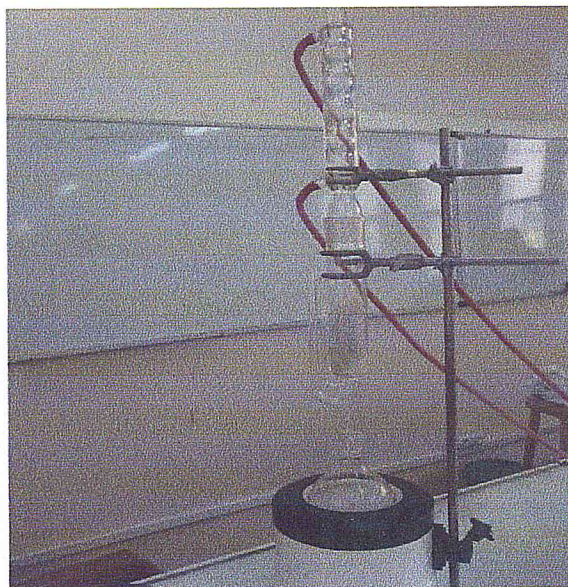


Figure 12 : montage de Soxhlet

Il est composé de :

- Une source de chaleur (chauffe ballon),
- Un ballon de distillation de capacité de 500 ml rempli au 300ml d'hexane surmonté par un Soxhlet contenant la matière végétale,
- Un coude reliant le Soxhlet au réfrigérant,
- Le réfrigérant est alimenté par un système de refroidissement.

III.3.2. Protocole expérimental d'extraction de l'huile végétale

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un extracteur de Soxhlet, une masse d'échantillon solide (graine de cresson alénois), pesée est placée dans un papier filtre bien fermé de manière à éviter les transferts des particules d'échantillon solides dans le ballon de distillation à son tour placé dans la chambre d'extraction d'un appareil de Soxhlet de 200 mL de capacité. L'échantillon solide est ensuite extrait sous reflux. Le papier filtre est alors retiré de la chambre du Soxhlet. L'huile végétale est récupérée après l'évaporation de l'hexane dans un évaporateur rotatif à 67°C, ensuite elle est mise dans un flacon propre, pesée et conservée pour d'autres utilisations.

III.4. Prétraitement enzymatique :

L'huile des graines des plantes a été récupérée traditionnellement par la pression hydraulique et l'extraction par solvant. Les limitations de ces processus comprennent les exigences des instruments spéciaux et la consommation d'énergie. Les matières premières doivent souvent être conditionnées avant d'être extraite par un solvant. Ce prétraitement qui vise à rompre les parois des cellules renfermant le produit à extraire consiste généralement en une action mécanique (pression, broyage, concassage) ou thermique [65]. Ce prétraitement a pour effet de réduire la consommation d'énergie et d'augmenter le débit de l'extraction. Des prétraitements plus ménageant tels que ceux mettant en œuvre des enzymes peuvent aussi être appliqués. Ainsi un traitement enzymatique est parfois exécuté avant l'extraction des huiles végétales. Cette façon de faire permet d'obtenir des produits de meilleure qualité.

Les mécanismes d'extraction varient grandement selon la nature du produit traité, cependant, globalement une extraction au solvant se compose des étapes suivantes [66]

- Diffusion du solvant dans la couche externe des solides,
- Transfert du solvant dans les ports du solide.

Le prétraitement enzymatique a récemment révélé être une autre méthode alternative, qui ouvre des parois cellulaires par biodégradation et l'extraction de l'huile à partir des plantes. Cependant, le prétraitement enzymatique est influencé par plusieurs facteurs tels que la concentration de l'enzyme, la température, le temps d'incubation et le pH, qui en coopération (ensemble) affectent l'activité enzymatique.

II.4.1 Mode opératoire

- On place 30g des graines de cresson alénois sont séchées dans un verre à montre,
- On prépare une suspension enzymatique composée de l'enzyme choisi et 10ml d'eau pour chaque enzyme individuellement selon les différentes concentrations de l'enzyme (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2%) p/p. cette suspension est versée dans un bécher tout en agitant le mélange, ensuite on rajoute 10 ml d'acide acétique pour maintenir le pH entre 4,5 et 5.
- La préparation ainsi obtenue est placée dans un incubateur, elle est portée à une température de 45C° pendant une période allant de 2H à 4H qui par la suite sera sujette à l'extraction de l'huile végétale par Soxhlet.

Les deux paramètres PH et température d'incubation sont maintenus constants suite à des travaux déjà réalisés [67,68], où ces deux paramètres ont été déjà optimisés et ont présenté des meilleurs résultats.

III.5.Mesure du taux d'humidité

5g d'échantillon finement broyé est chauffé dans une étuve à une température de 105 °C pendant 24 h (jusqu'à un poids constant).

Le taux d'humidité, exprimé en pourcentage par rapport au poids frais des échantillons, est donné comme suit :

$$\text{Teneur en eau} = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \text{ (g/100g de matière sèche)} \quad (\text{eqt 1})$$

Où :

m_i : la masse de la prise d'essai avant séchage,

m_f : la masse de la prise d'essai après séchage.

III.6.Calcul du rendement de l'huile végétale

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport de la masse d'extrait obtenu sur la masse de la matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M \text{ Extrait}}{M_{mv}} \times 100 \quad (\text{eqt 2})$$

R (%) : Rendement en extrait (%)

M Extrait : Masse de l'extrait en grammes

M mv : Masse de la matière végétale en grammes *sèche*

III.7.Détermination des propriétés physico-chimiques de l'huile végétale de « cresson alénois »

Nous avons déterminé Les propriétés organoleptiques (aspect, couleur, odeur) et physico-chimiques de l'huile végétale de « Cresson Alénois » extraite avec et sans prétraitement enzymatique suivant la norme A.F.N.O.R. [69]. Les modes opératoires sont données en annexe 1 .

III.8. Analyse des acides gras

III.8.1. Analyse des acides gras libres

Les acides gras libres contenus dans les huiles extraites sont dosés selon la méthode officielle AOCS Ca 5a-40 [70]. Les volumes de réactifs et de produits ajoutés sont fonction de tests préliminaires permettant d'évaluer un pourcentage d'acidité libre dans l'extrait. A une masse d'huile (1g), est ajouté un volume d'éthanol (20mL) et 3 goutte de phénolphtaléine comme indicateur coloré. La solution est alors titrée à l'aide d'une solution alcaline normée précisément (1N) sous agitation vigoureuse jusqu'à apparition d'une teinte rose. Chaque expérience est réalisée trois fois, la moyenne des résultats est reportée. Le pourcentage d'acides gras libres dans l'extrait est donné en % d'acides gras libres en équivalent acide oléique selon la formule donnée ci-après :

$$\text{Acidité libre (ég acide oléique, \%)} = \frac{\text{volume de soude versée, ml} \cdot N \cdot 28.2}{\text{la masse de prise d'esai g}} \quad (\text{Eq4})$$

III.8.2. Analyse des diènes conjugués par spectrophotométrie UV-Vib

Ces mesures sont réalisées selon la méthode officielle AOCS Cd 7-58 [71] par spectrophotométrie UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre. Une quantité d'huile est diluée dans du *n*-hexane pour spectroscopie de manière à avoir une absorbance comprise entre 0,2 et 0,8. Les absorbances sont effectuées à 25°C et sont relevées à 233 nm contre le solvant après avoir effectué la dilution adéquate de l'échantillon. Chaque expérience, pour les huiles concernées est réalisée trois fois et la moyenne des résultats est reportée. L'expression des résultats s'exprime comme décrit ci-après :

$$\text{Absorptivité 233 nm} = a_{233\text{nm}} = \frac{A}{b \cdot c} \quad (\text{Eq 5})$$

Où,

- A = Absorbance observée,
- b = Longueur de la cuve en cm,
- c = Concentration finale de l'échantillon (g/L) utilisée pour la mesure de A.

$$\text{Puis, on aura : } a_{\text{diène}} = a_{233} - a_0 \quad (\text{Eq 6})$$

Ainsi, on détermine une absorptivité à une longueur d'onde donnée après application d'un facteur de correction en fonction de l'échantillon étudié. Pour des acides gras, on aura une correction : $a_0 = 0,03$. Le pourcentage de diènes conjugués dans l'extrait étudié sera déterminé par le produit suivant :

Absorbance du solvant

$$\text{Diènes conjugués, \%} = 0,91 * a (\text{diène}) \quad (\text{Eq 5})$$

III.8.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

III.8.3.1. Préparation des dérivés esters méthyliques d'acides gras

Les triglycérides contenus dans les extraits ont été dérivés sous forme d'esters méthyliques d'acide gras. Les dérivés méthyliques d'acides gras ont été préparés par *trans*-estérification selon la méthode officielle AOCS Ce 2-66 [72]. Ainsi, une catalyse basique est utilisée pour la dérivation des acides gras en utilisant une quantité définie (4 ml) de soude méthanolique 0,5M additionnée à une masse spécifique (100 – 250 mg) d'huile brute extraite. Le mélange ainsi préparé est chauffé pendant 10 min dans un ballon de 50 ml surmonté d'un réfrigérant, et un volume de 5 ml de réactif BF₃-méthanolique est ajouté à la solution. Le ballon est alors porté à ébullition pendant 2 min et 5 mL de *n*-heptane sont ajoutés par le réfrigérant. Après 1 min, le ballon est retiré du chauffage et un volume de 15 mL de solution saturée en chlorure de sodium est ajouté. Le ballon est ensuite bouché puis agité vigoureusement pendant 15 sec. Une petite quantité de la phase heptanique surnageante est prélevée puis transférée dans un tube à hémolyse contenant une pointe de spatule de sulfate de sodium anhydre. Les échantillons sont ensuite filtrés sur filtre en cellulose régénérée 0,2 µm avant d'être injectés directement en chromatographie gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse. Après dérivation, les analyses sont réalisées trois fois au minimum.

III.8.3.2. Conditions opératoires:

L'huile a été analysée par CGMS en utilisant un chromatographe Perkin Elmer serie clarus 500 couplée un spectromètre de masse Perken elmer.

Injecteur

Temperature : 250 C°

Mode d'injection : split 1 :15

Volume injecte: 1 ul

Colonne

Type : hp-5ms

Dimension : long 30 m*0.25 *0.25

Longueur: 30 m

Température du four : 80°C pendant 3 min, 4°C/ min jusqu'à 220°C , isotherme pendant 5min

Gaza vecteur : hélium

Débit GV : 47 cm /s

Détecteur de masse

Ionisation: Impact électronique 70 eV

Mode: Balayage 80 - 600 uma

Analyseur: quadripôle

III.9. Activités biologiques

III.9.1. Etude de l'activité antibactérienne d'HV des graines de « *cresson alénois* »

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile végétale par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des souches de référence bactérienne connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogènes pour l'homme et l'animal [73,74].

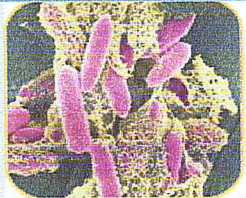
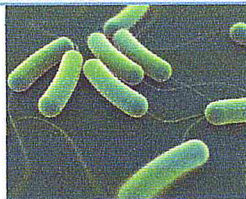
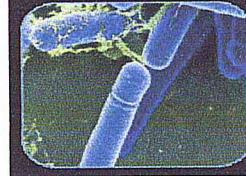
III.9.1.1. Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude sont référencées ATCC (American Type Culture

Collection) (voir tableau 10). Elles ont été choisies pour leurs contaminations élevées et leurs pathogénicités.

Les tests sont réalisés sur quatre bactéries (*Escherichia coli* (Gram⁻), *Salmonella typhi* (Gram⁻), *Staphylococcus aureus* (Gram⁺), *Bacillus subtilis* (Gram⁺)) provenant du laboratoire de laboratoire algérienne du médicament (LAM). Ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10ml de l'eau physiologique. Les caractéristiques des différentes souches utilisées sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau 10 : Caractéristiques des souches bactériennes testées.

Souche bactérienne	Référence	Gram	Allures	Pathologie
<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	-		Entéropathogène : Gastroentérite, infections intestinales
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC14028	-		Pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	+		Pathogène
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	+		Non pathogène

III .9.1.2. Technique en milieu solide :

III.9.1.2.1. Méthode des aromatoigrammes

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée Antibiogramme [75]. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes. Dans cette méthode, nous utilisons des disques de 9 mm de diamètre, imprégnés de 20 µl d'HV. Nous déposons ces disques à la surface d'un milieu géloséensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24h. L'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition » autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en

millimètre (Figure 19) [76]. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile végétale, plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

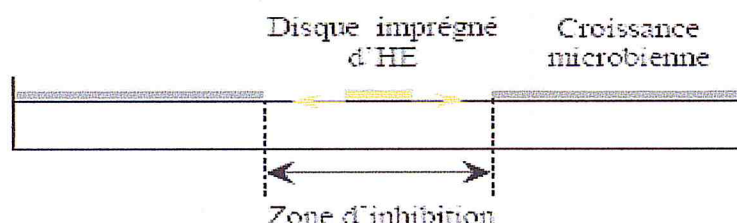


Figure 17 : la zone d'hnibition

III.9.1.2.2. Milieux de culture

Nous avons utilisé Muller Hinton comme milieux de culture pour les bactéries.

III.9.1.3. Protocole expérimental

- **Préparation des milieux de culture**

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir des cultures jeunes. On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 10 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes pour obtenir une suspension légèrement opale ensuite leurs densités optiques (DO) ont été mesurées à 625 nm. La densité optique des suspensions est fixée à 0,1 qu'est l'équivalent de 0.5Mc Farland.

- **Ensemencement**

Des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la solution bactérienne, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

- **Dépôts des disques**

A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de papier de Wathman 9 mm du diamètre, contenant l'huile végétale des graines de « *Cresson alénois* » sans prétraitement enzymatique (A) et avec prétraitement enzymatique « cellulase (B) » et « pectinase (C) » sont déposés sur la surface gélosée. Après diffusion de l'HV dans la gélose pendant 30min à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture:** la lecture s'effectue après 24h d'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HV. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des microorganismes cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition [77] :

Tableau 11 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches

Diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
0-8 mm	non sensible
9-14 mm	Sensible
15-19 mm	très sensible
> 20 mm	extrêmement sensible

III.10. Activité antioxydante

III.10.1. Les antioxydants

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres, ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme. Ce sont des composés réactifs comportant un électron célibataire nécessaire à des mécanismes vitaux [78] qui deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides [79] et des acides nucléiques [80] , en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré

et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et l'artériosclérose.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes d'origine nutritionnelle

III.10.1.1. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines anti oxydantes (Superoxydase dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leurs quantités diminuent avec l'âge.

III.10.1.2. Les antioxydants exogènes :

Ces antioxydants sont présents dans l'alimentation. Il peut s'agir des polyphénols, en particulier les flavonoïdes ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse ou de Vitamines A, E et C. Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés. [81]

III.10.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante

III.10.2.1.Principe : l'activité antioxydante est mise en évidence par la méthode de piégeage du radical libre DPPH selon le protocole [82] avec quelques modifications.

Les antioxydants réduisent le DPPH, radical relativement stable, ayant une couleur violette en un composé jaune. L'analyse de la vitamine E est faite simultanément pour comparaison.

III.10.2.2.Mode opératoire

- Le DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution de concentration de 0.004%, en raison de 4 mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol
- Un témoin négatif contenant uniquement la solution DPPH est préparé.
- Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min. l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 517nm.
- Les différentes concentrations d'huile ainsi que celle de la Vitamine E dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 40 mg/ml.

III.10.2.3.Expression des résultats : le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abst - Abse) / Abst] \times 100$$

Abst : Absorbance de contrôle (Témoin)

Abse : Absorbance de l'échantillon

L'activité anti oxydante est exprimée en IC50. Ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité du DPPH. La valeur d'IC50 est inversement proportionnelle à l'activité d'huile [83].

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

IV. Extraction de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois par soxhlet

L'huile végétale des graines de cresson alénois sèche a été extraite par Soxhlet à l'échelle laboratoire, la mesure de taux d'humidité est de l'ordre 6%

IV.1. Effet de la masse des graines et du temps d'extraction sur le rendement en huile végétale avec et sans broyage et sans prétraitement enzymatique

IV.1.1. Effet de la masse :

Pour cette étude, nous avons effectué différents essais où le temps d'extraction pour chaque essai est considéré constant (4H). Les résultats sont représentés par le graphe suivant :

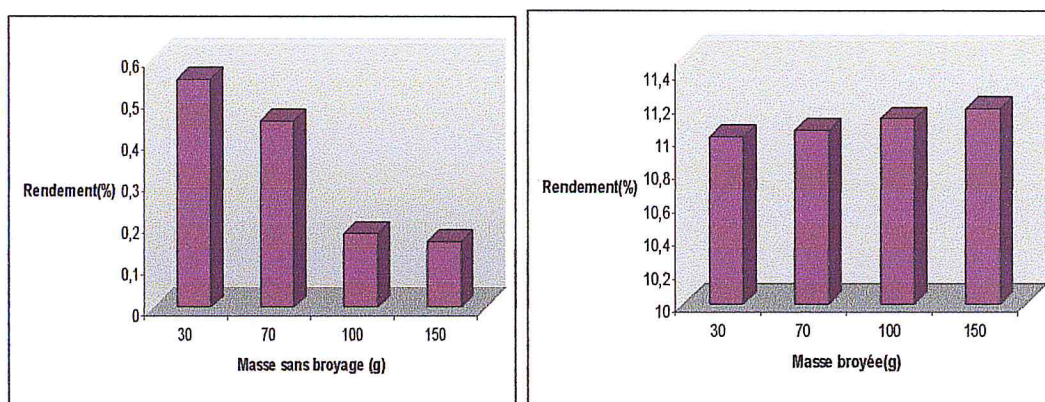


Figure 18: Variation du rendement en fonction de la masse sans et avec broyage

D'après les résultats, on constate que le rendement en HV varie en fonction de la masse végétale. Le rendement en huile végétale extraite du cresson alénois broyée est de l'ordre de 11% pour les différentes masses, 30g, 70g et 100g. Une légère augmentation (11,1%) est obtenue lorsque la masse broyée est 150g. En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec cresson alénois sans broyage, le rendement maximal est 0,66% lorsque la masse est 30 g,

Au-delà il diminue. On conclut que le broyage de la matière a donné un meilleur rendement. Les résultats ont démontré que la masse végétale optimale à utiliser pour toutes les expériences est 30g de cresson alénois broyé.

IV.1. 2. Effet du temps d'extraction

Pour cette étude nous avons pris la masse de la matière végétale comme constante (30g) et le temps d'extraction variable. Alors nous avons effectué quatre manipulations. Les résultats sont mentionnés sur le tableau suivant :

Tableau 12 : variation du rendement en fonction du temps d'extraction avec et sans broyage

Temps d'extraction (H)	Rendement (%) de la masse sans broyage	Rendement (%) de la masse broyée
1.5	0.15	10.99
3	0.20	11
4	0.55	11,01
5	0.69	11.05

- D'après ce tableau, on remarque que le rendement des graines de cresson alénois sans broyage augmente progressivement jusqu'à atteindre un taux de 0,69% au bout de 5h et le rendement des graines de cresson alénois avec broyage augmente progressivement jusqu'à atteindre un taux de 11.05% au bout de 5h, ce rendement est légèrement supérieur à celui obtenu pendant 1H30 min. Les résultats montrent que le temps d'extraction 1H30min, est le temps optimale et pour toutes les extractions.

IV.2. Prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase) :

Un prétraitement enzymatique de la matière a été réalisé en étudiant l'effet de la concentration et du temps d'incubation de l'enzyme (cellulase, pectinase). Les conditions expérimentales utilisées sont les conditions de masse et temps d'extraction déjà optimisés (30 g et 1H30min).

IV.2.1. Optimisation du temps d'incubation :

Les graines de *Lépidium Sativum*L. Traitées par la cellulase et par la pectinase ont été soumises à différentes périodes d'incubation (de 2H à 4H). L'effet du temps d'incubation sur le rendement en huile de Cresson Alénois est représenté dans la figure 19. Le traitement de la matière avec la cellulase, a donné un rendement égal à 4,01% pour une durée d'incubation de 2H et une légère augmentation en rendement (4,02 et 4,03%) a été observée après une période

d'incubation de 3H et de 4H (Fig.19), mais cette valeur reste inférieure par rapport aux témoins (10,99%), sans le prétraitement enzymatique. L'utilisation de l'enzyme pectinase a donné un rendement (3,67) après une période d'incubation égale à 2H, inférieure à celle de la cellulase et une faible augmentation du rendement (3,68 et 3,69%) est observée après une incubation de 3 H et 4H. Ces résultats ont démontré que la période d'incubation de 2H était idéale pour tous les traitements enzymatiques.

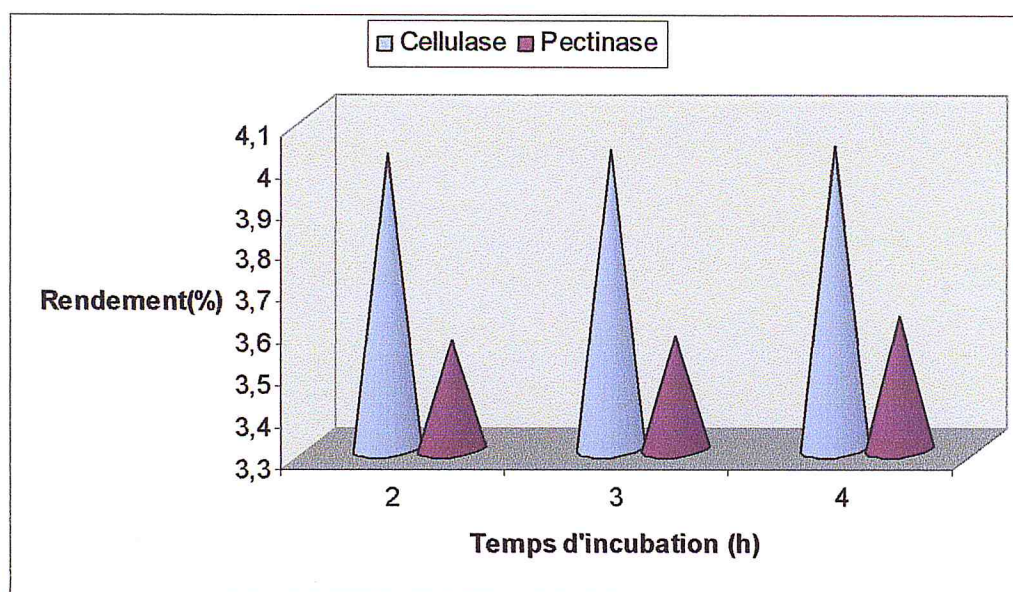


Figure 19 : Variation du rendement en fonction de temps d'incubation

IV.2.2. Optimisation de la concentration de l'enzyme

Le prétraitement enzymatique a conduit à un meilleur rendement de 4,01% pour la cellulase et 3,67% pour la pectinase lorsque la concentration est égale à 0,1% pour les deux enzymes. Notons que ce rendement est toujours inférieur au témoin (10,99%) extrait sans prétraitement enzymatique. Les résultats sont représentés dans la figure 20.

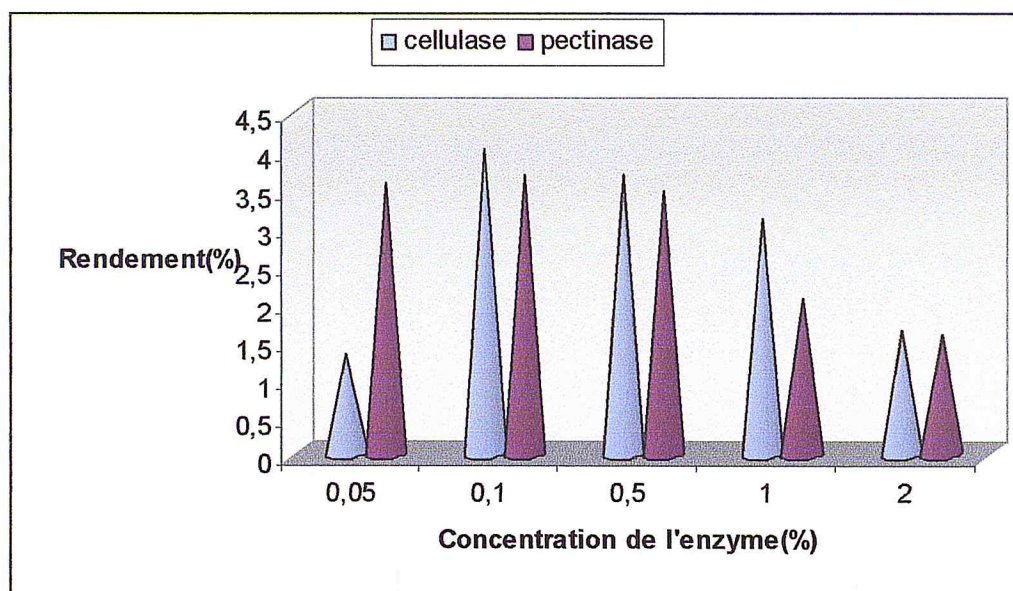


Figure 20 : Evolution du rendement de l'huile végétale des gaines de Cresson Alénois broyé avec prétraitement enzymatique (cellulase et pectinase) en fonction de la concentration enzymatique

• Discussion

L'utilisation du prétraitement enzymatique du cresson alénois a donné une diminution du rendement en huile des graines broyées dans le cas du traitement enzymatique avec la cellulase et la pectinase. Le rendement en huile dans le cas de la cellulase était de l'ordre de 4,01 % et pour la pectinase était égale 3,67% contre 10,99 % dans l'échantillon témoin extrait par l'hexane et sans prétraitement enzymatique.

La diminution du rendement dans le prétraitement enzymatique peut être due à cause du mucilage. Les graines de cresson alénois sont recouvertes d'une couche de mucilage qui se gélifie au contact de l'eau. Le cresson est une mucilagineuse, c'est-à-dire qu'il dégage une sorte de gel (le mucilage composée de cellulose et acide uronique contenant des polysaccharides [50]). L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau.



Figure 21 : le mucilage

Suite à l'optimisation de la concentration et du temps d'incubation du prétraitement enzymatique de la matière broyée, une étude comparative a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales ($m=30g$, $T_{ex}=1h:30min$, $T_{in}=2h$, $[C]=0.1\%$ (P/P)) pour l'extraction des graines de cresson alénois sans broyage et avec prétraitement enzymatique. Les résultats sont présentés dans le tableau 15 :

Tableau 15: rendement en huile végétale de l'espèce sans broyage traitée par l'enzyme

Les graines sans broyage avec prétraitement enzymatique	Rendement %	
	Cellulase	Pectinase
Concentration (0.1%, p/p)	1.92	1.77

On remarque qu'il y'a une diminution du rendement de prétraitement enzymatique de la matière sans broyage.

IV.3. Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois

L'huile végétale des graines de Cresson Alénois obtenue par soxhlet présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de cresson alénois

Composé	Aspect	Couleur	Odeur
Huile des graines broyées sans prétraitement enzymatique (1)	Liquide	Jaune foncée	Caractéristique
Huile des graines broyées avec prétraitement enzymatique (2)	Liquide	Jaune	Caractéristique
Huiles des graines sans broyage (3)	Pâteux	Jaune	Caractéristique

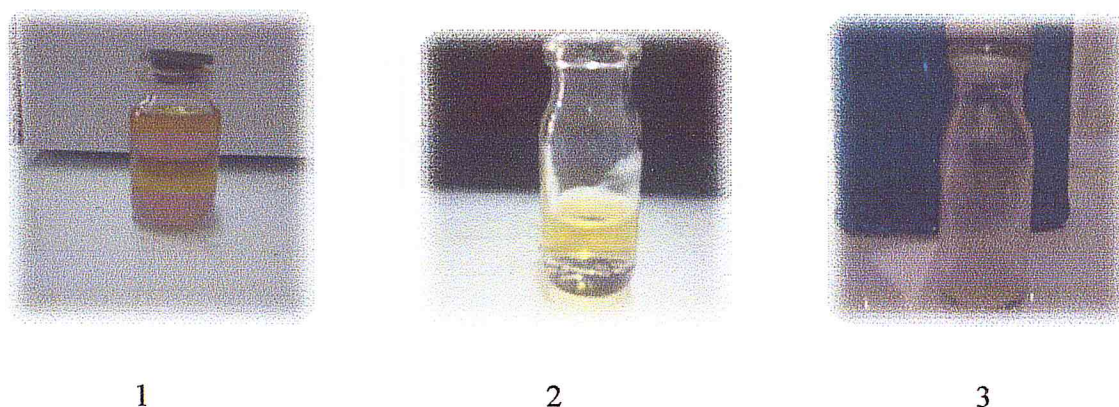


Figure 22 : huile végétale des graines de cresson alénois

IV.4. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés par le tableau

Tableau 17 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois

Les huiles sans et avec prétraitement enzymatique	densité	Pouvoir rotatoire	Indice de réfraction	Indice d'acide libre	Indice d'ester	Indice de saponification	UV -vib <i>Terme de []</i>
HV (S.P.Enz)	0.92	0	1.472	0.45	93.05	93.5	2.73
HV (A.P.Enz) cellulase	—	0	1.474	0.46	79.68	80.14	5.18
HV (A.P.Enz) pectinase	—	0	1.474	0.46	79.68	80.14	5.18

S.P.Enz : Sans Prétraitement Enzymatique

A.P.Enz : Avec Prétraitement Enzymatique

- La densité des huiles est généralement inférieure à 1 (sauf quelques exceptions), ce qui est vérifié pour notre huile

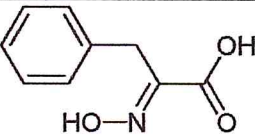
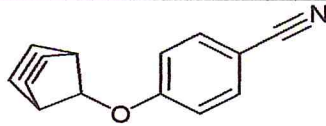
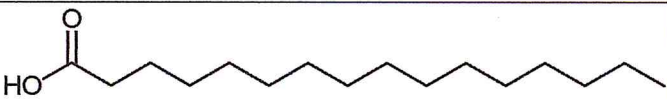
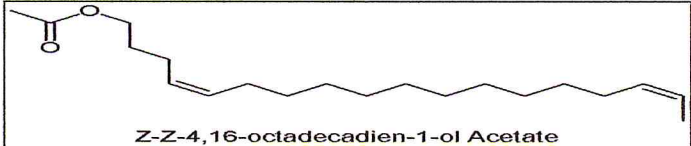
- La valeur du pouvoir rotatoire mesuré montre l'absence du carbone asymétrique et donc aucune activité optique.
- La valeur d'indice de réfraction mesurée est légèrement supérieure à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1,333) et huile d'olives à 20°C 1.46. Le faible indice de réfraction d' HV indique leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques [73].
- L'indice d'acide d'HV donne une idée sur le taux d'acides libres, un indice d'acide faible inférieure à 1 caractérise la pureté, la stabilité et la qualité de notre huile.
- L'indice de saponification nous révèle la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras, il caractérise le poids moyen de la matière grasse auquel il est inversement proportionnel : plus le poids moléculaire est élevé, plus l'indice de saponification est faible. [73].
- L'analyse par spectre photométrie ultraviolet-visible (UV-VIB) donne une idée sur le nombre d'insaturation de la composition chimique

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HV. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HV.

IV.5. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée la spectrométrie de masse (CG-MS).

L'huile végétale extraite par Soxhlet avec et sans prétraitement, a été ensuite, analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les conditions opératoires sont détaillées précédemment. Les tableaux 19 et 20 regroupent la composition de l'huile végétale

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois extraite par soxhlet sans prétraitement

N°	Temps de retention (min)	Composé
1	10.863	 benzenepropanoic acid, alpha-(hydroxy imino)
2	18.078	 4-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene-7-yl-oxy benzonitrile
3	34.562	 N-hexadecanoic acid
4	38.72	 Z-Z-4,16-octadecadien-1-ol Acetate

L'examen de tableau montre que la composition chimique de l'huile sans prétraitement est dominée par les acides gras tels que : acide alpha (hydroxyimino) Benzène propanoïque , 4-bicyclo[2-2-1] hepta-2,5-diene-7-yl-oxy benzonitrile, acide palmitique, acétate z,z-4-16, octadecadien-1-ol ces résultats incomparables avec les résultats de la bibliographie [43,47]

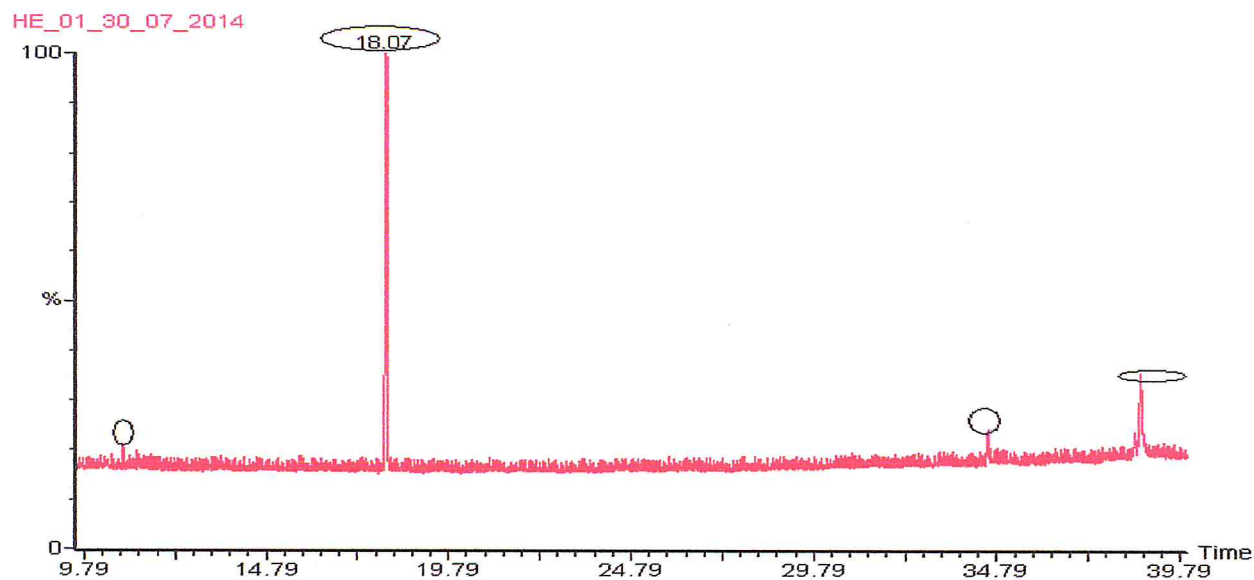


Figure 23 : profil chromatographique d'analyse de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois sans prétraitement

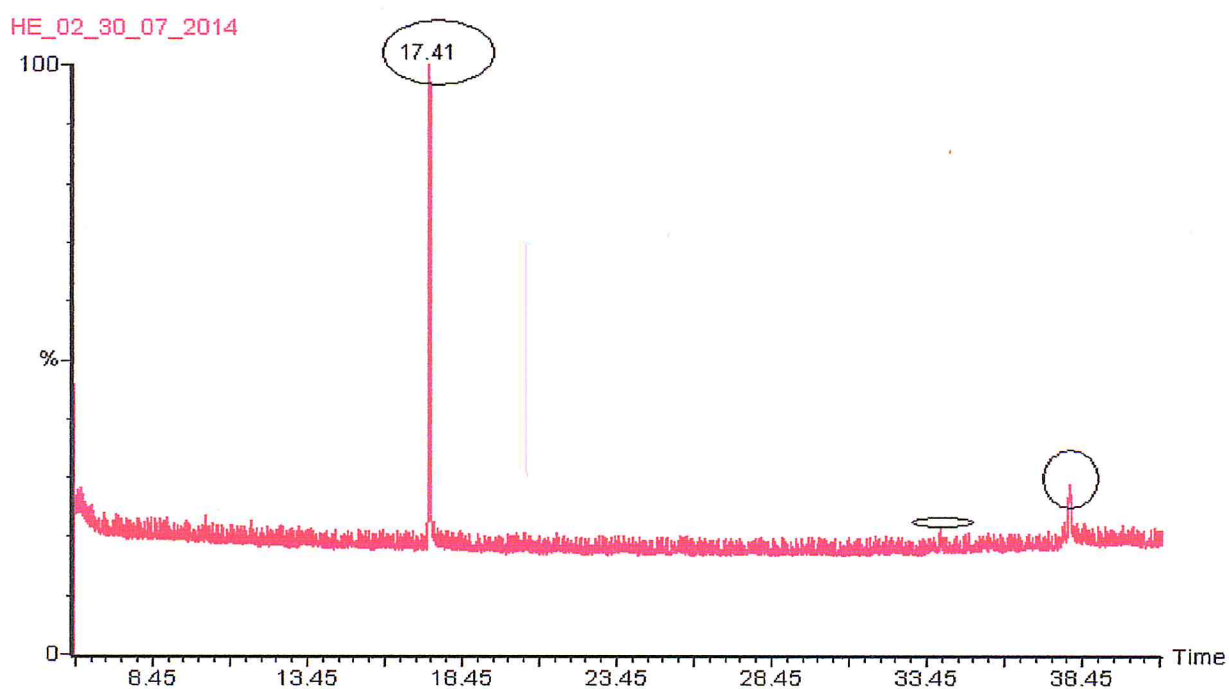
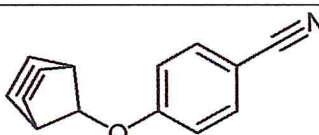
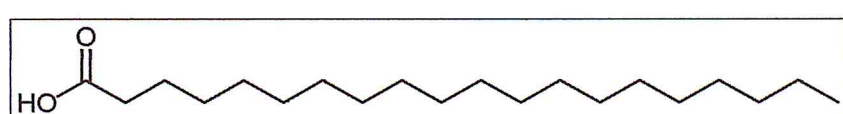
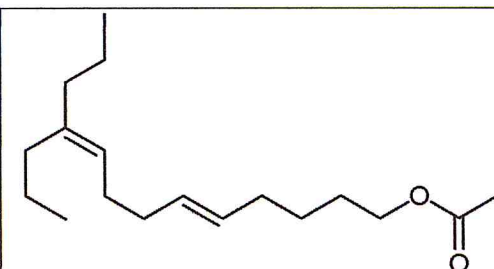


Figure 24 : profil chromatographique d'analyse de l'huile végétale des graines de Cresson Alénois avec prétraitement (cellulase, pectinase)

Tableau 19 : les composés par CG-MS des deux huiles de prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase)

N°	Temps de retention	Composé
1	17.405	 4-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene-7-yl-oxy benzonitrile
2	38.058	 Eicosanoic acid
3	33.884	 10-Propyl-(E)-5,9-tridecadienyl acetate

L'examen de tableau montre que la composition chimique de l'huile sans prétraitement est dominée par les acides gras tels que : 4-bicyclo[2-2-1] hepta-2.5-diene-7yl-oxy benzonitrile , acide eicosanoïque, acétate de 10-propyl-[E]-5,9-tridecadienyl ces résultats incomparables avec les résultats de la bibliographie [43,47]

IV.6.Activités biologiques

IV.6.1.Evaluation de l'Activité antibactérienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien des trois échantillons : l'huile végétale sans et avec prétraitement enzymatique des graines de « Cresson Alénois » par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos échantillons est mesurée en diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons à tester vis-à-vis de quatre germes (*Escherichia coli* (Gram⁻), *salmonella typhi* (Gram⁻), *Staphylococcus aureus* (Gram⁺), *Bacillus subtilis* (Gram⁺)). Après 24 h d'incubation à une température de 37° C. Les résultats qualitatifs sont représentés dans le tableau 2

Tableau 20: la zone d'inhibition des souches bactériennes

Les Souches bactériennes	Diameter d'inhibition		
	A	B	C
E.coli	<8	26 mm	26 mm
S.typhi	<8	26 mm	24 mm
S.aureus	<8	40 mm	40 mm
B.subtilis	<8	16 mm	16 mm



Figure 25 : Aromatogramme des deux bactéries gram (-) *E.coli* et *S.typhi* des trois huiles A, B, C

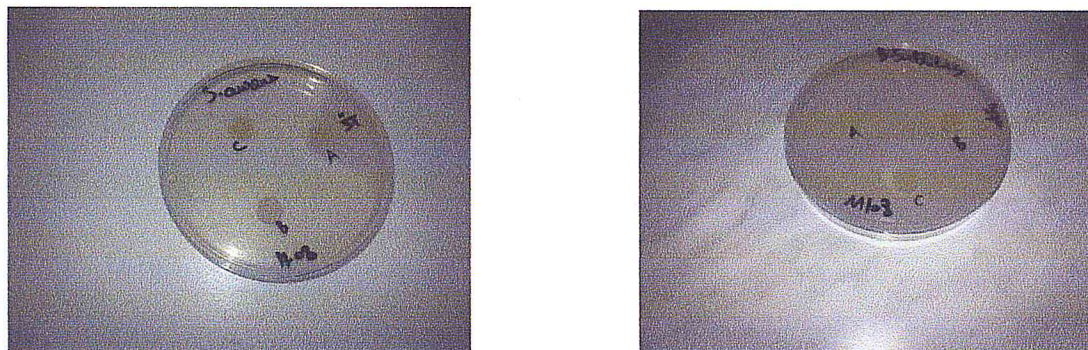


Figure 26 : Aromatogramme des deux bactéries gram (+) *S.aureus* et *B.subtilis* des trois huiles A, B, C

- L'apparition des zones d'inhibition avec des diamètres différents qui entourent les disques imprégnés de l'huile végétale de A, B et C, cela s'explique par le fait que les souches bactériennes: (*Escherichia coli* (Gram⁻), *Salmonella typhi* (Gram⁻), *Staphylococcus aureus* (Gram⁺), *Bacillus subtilis* (Gram⁺)). Sont sensibles vis-à-vis l'huile.
- La bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible à l'HV avec prétraitement enzymatique B et C avec une zone d'inhibition de 26 mm, pour les deux huiles. Elle ne présente pas une sensibilité vis-à-vis l'huile végétale sans prétraitement enzymatique (A) avec un diamètre (<8 mm).
- La bactérie *Salmonella typhi* est extrêmement sensible à l'HV avec prétraitement enzymatique B et C avec une zone d'inhibition de 26 mm, 24 mm respectivement. Elle ne présente pas une sensibilité vis-à-vis l'huile végétale sans prétraitement enzymatique (A) avec un diamètre (<8 mm).
- La bactérie *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible à l'HV avec prétraitement enzymatique B et C avec une zone d'inhibition de 40 mm pour les deux huiles. Elle ne présente pas une sensibilité vis-à-vis l'huile végétale sans prétraitement enzymatique (A) avec un diamètre (<8 mm).
- La bactérie *Bacillus subtilis* n'est pas sensible à l'HV sans prétraitement enzymatique qui a donné une zone d'inhibition (< 8 mm). Par contre elle est très sensible vis-à-vis l'huile végétale extraite à partir des graines traitées avec les deux enzymes (cellulase (B) et pectinase (C)) dont le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 25mm.
- On conclut que le prétraitement enzymatique donne un meilleur résultat d'inhibition contre les bactéries par rapport à l'huile sans prétraitement enzymatique.

L'histogramme suivant présente le comportement de l'huile végétales avec et sans prétraitement enzymatique vis-à-vis les souches bactériennes.

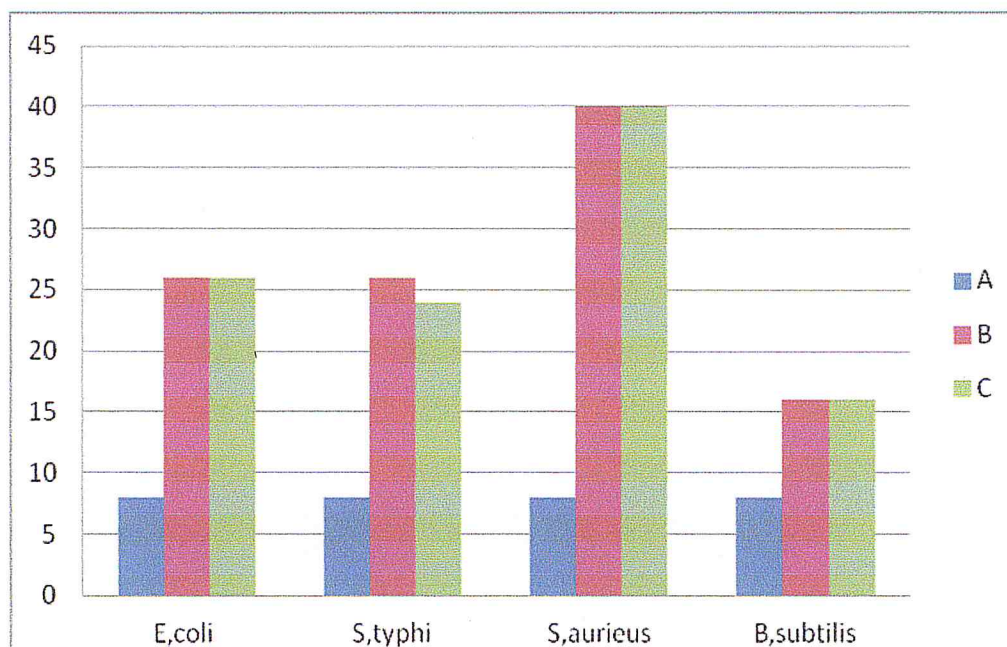


Figure 27 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries

IV.7.Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydant d'huile végétale de « cresson alénois » a été effectuée en présence d'un antioxydant de référence « l'acide tocophérol » : Vitamine E.

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile de « Cresson Alénois » est inférieur à celui de la vitamine E pour les concentrations inférieures à (10mg/ml), suivi d'une fluctuation avant de se stabiliser sur les mêmes concentrations.(Fig 22.) L'huile végétale a révélé un pourcentage d'inhibition de $(88 \pm 22)\%$ tandis que la vitamine E est inhibée avec $(88 \pm 16)\%$ de DPPH.

Tableau 21 : Résultats de la lecture des DO et de l'inhibition de radical libre DPPH :

composées	Concentrations (mg/ml)	40	32	24	16	8	4
HUILE	DO	0.010	0.013	0.019	0.021	0.027	0.53
	% de réduction	98.31	97.80	96.80	96.46	95.45	43.09
Huile cellulase	% de reduction	98.28	97.79	96.72	96.30	95.40	43.05
Huile pectinase	% de reduction	98.20	97.75	96.70	96.26	95.32	43.03
Vit E	DO	0.015	0.019	0.039	0.016	0.032	0.013
	% de reduction	97.33	96.72	93.32	97.20	94.5	86.4

➤ DO étalon = 0.594

$$\text{➤ \% d'inhibition} = \frac{DO_{\text{temoin}} - DO_{\text{echantillon}}}{DO_{\text{temoin}}} * 100$$

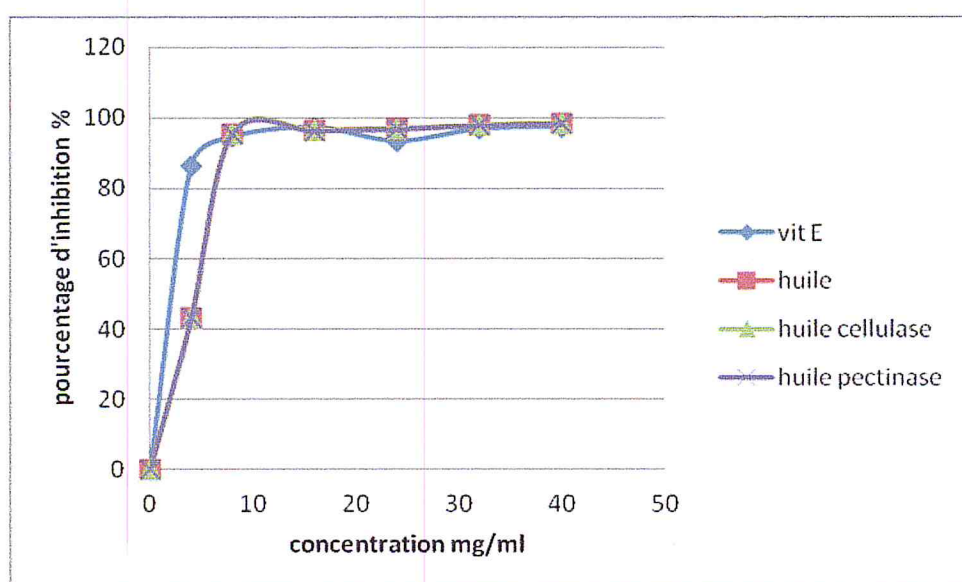


Figure 31 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH de vitamine E, de l'huile sans et avec prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase) des graines de cresson alénois

IV.8. Détermination de la valeur EC50

L'EC50 a été apparemment introduit par Brand-williams et ses collaborateurs. Elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [84].

Les EC50 de l'huile de cresson alénois avec et sans prétraitement enzymatique et le standard sont déterminées graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée représente l'activité antioxydant en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau 22

Tableau 22 : valeur de l'EC50 des huiles sans et avec prétraitement enzymatique avec le standard Vit C

composées	EC50 (mg /ml)
Vitamine E	0.46
Huile	2.32
Huile cellulase	2.34
Huile pectinase	2.35

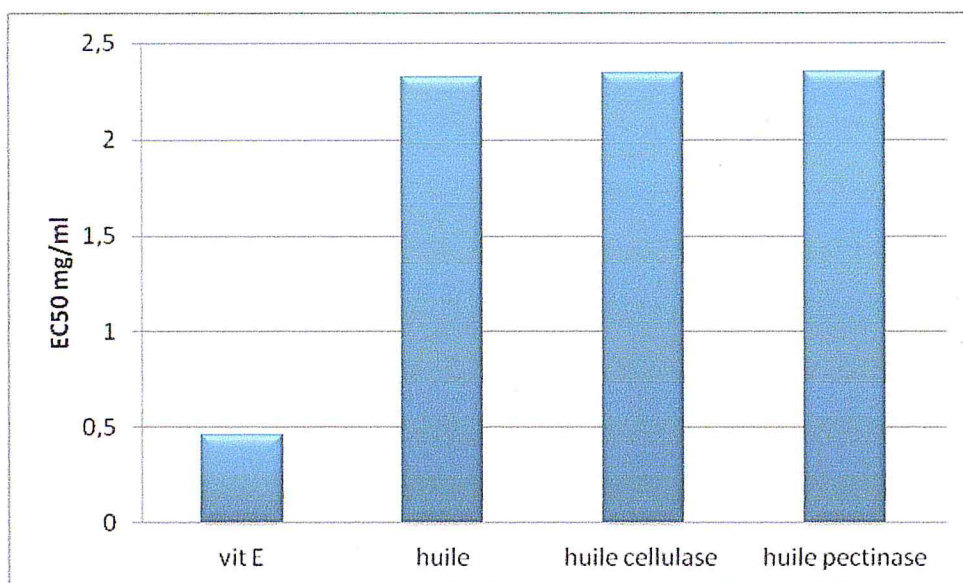


Figure 32 : Comparaison des valeurs EC50 de notre huile et la vitamine E

Nous constatons que l'EC50 de 3 huiles végétales de « cresson alénois » est supérieure à celle de l'acide tocophérol qui est très actif à cause de son hydro-solubilité marquée. Nous déduisons par conséquent que l'action de notre huile est inférieure à celle de la vitamine E.

En Effet, le pouvoir antioxydant est d'autant plus important que la capacité de piéger le radical libre DPPH soit élevée.

D'après les résultats illustrés dans l'histogramme on remarque que nos échantillons ont un pouvoir antioxydant très faibles.

Le genre *lipéduim sativum* L est connu pour son pouvoir antioxydant à cause de ces composés chimiques comme les flavonoïdes, les polyphénols et les caroténoïdes Aussi d'autres études ont montré que les composés phénoliques comme les flavonoïdes et les acides phénoliques sont considérablement plus antioxydants que la Vitamine E et la vitamine C [85].

CONCLUSION

Conclusion

Cette étude a été réalisée sur l'effet des enzymes (cellulase et pectinase) sur l'huile végétale de Cresson alénois et son impact sur le rendement, l'activité antibactérienne et antioxydante. L'extraction a été réalisée par le procédé de soxhlet.

- Le rendement obtenu est de 10.99% pour l'huile végétale broyée sans prétraitement enzymatique et 4.01%, 3.56% pour le prétraitement enzymatique cellulase, pectinase respectivement
- la cinétique d'extraction de nous a permis de déduire qu'après 1.30H d'extraction, la totalité de l'HV est récupérée.
- Une étude analytique a permis de caractériser l'huile végétale par ses indices physico-chimique. Du point de vue qualitatif, la composition chimique de l'HV a été déterminée par l'analyse CG/MS qui a révélé l'existence de différents composés.
- Les résultats des tests d'activités antibactériennes de l'huile végétale avec les souches bactériennes : (*Escherichia coli* (Gram⁻), *salmonella typhi* (Gram⁻), *Staphylococcus aureus* (Gram⁺), *Bacillus subtilise* (Gram⁺)). La sensibilité des microorganismes testés vis-à-vis l'HV a montré que les souches bactériennes présentent une sensibilité avec une zone d'inhibition qui est de l'ordre de 16 à 40 mm pour le prétraitement enzymatique (cellulase, pectinase) et aucune sensibilité pour l'huile végétale sans prétraitement enzymatique.
- Le pouvoir antioxydant de l'huile végétale déterminé par la méthode au DPPH a révélé que l'huile végétale présentait un pouvoir antioxydant relativement faible ; 2.32 mg/ml pour l'huile sans prétraitement enzymatique et 2.34, 2.35 mg/ml pour le prétraitement enzymatique cellulase et pectinase respectivement contre un EC50 égale à 0,46 mg/ml pour la vitamine E.

Références bibliographiques

- [1] **El Rhaffari et Zaid. 2004.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293-318p
- [2] **K. Hirasa, M. Takemasa .1998.** Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- [3] **C.Duraffourd , J-C.Lapraz , R.Chemli. 1997.** La plante médicinale de la tradition à l'ascience. 1^{er} congrès international. Tunis. Ed. Granche. Paris. 222p
- [4] **D.Mozafarian, A. Ascherio, 2005.** Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men *Circulation*, 111, 157-164
- [5] **NV.Cuong, K. Allaf. 2010.** Technical Aspects of Transesterification of Vegetable Oil: a General Review. *J Biomass and Bioenergy*, In Press.
- [6] **P. Beerens. 2007.** Screw-pressing of Jatropha seeds for fueling purposes in less developed countries. MSc. Dissertation, Eindhoven University of Technology.
- [7] **M.Puri, D.Sharma, and J.B.Colin. 2012.** Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. A review trends in biotechnology, vol.30, NO.1.
- [8] **K.M. Nadkarni, A.K. Nadkarni, 1954.** The Indian Materia Medica With Ayurvedic Unani and Home remedies, third ed., Popular Prakashan, Bombay, India, pp. 736–737.
- [9] **A.Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, et L.Cuadros-Rodríguez . 2009.** From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid Analysis, *Trends in Analytical Chemistry* doi:10.1016/j.trac.2008.12.005.
- [10] **J.L.Luque-a, M.D. Luque de Castro. 2004.** Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications, *Talanta* 64, pp. 571-577.

[11] **B.Desvergne, L.Michalik, et W.Wahli, 2006.** Transcriptional regulation of metabolism, *Physiological Reviews* **86**, pp. 465-514.

[12] **P.D. Tsitouras, F. Gucciardo, A.D. Salbe, C. Heward, et S.M. Harman. 2008.** High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults, *Hormone and Metabolic Research* **40**, pp. 199 205.

[13] **R.E.Majors. 2006.** Modern Technique for the Extraction of Solid Materials - An Update, *LC-GC North America* **24**, pp. 73-81.

[14] **O.Masson. 2007.** Biochimie : Bases biochimiques de la diététique, 2ème édition, La Voisier Ed.

[15] **C.Alais , G.Linden , L.Miclo . 2008.** Biochimie Alimentaire, 6em Edition de l'abrégé ed: Dunod, Paris

[16] **M. Guilloton , B. Quintard . 2003.** Biochimie: Dunod, Paris

[17] **G.Pellon . 1994.** Biochimie Structurale: Edition Nathan

[18] **J.Graille. 2003.** Lipides et corps gras alimentaires: La Voisier.

[19] **G.W.Gould.1991** antimicrobial compound in: Biotechnology and Food Ingredientseds Goldberg I et Williams Rvan Nostrand Reinhold , New York , pp 461 -483

[20] **A.Rosenthal , D.L.Pyle, K.Niranjan. 1996.** Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology* **19**:402-420.

[21] **J.Leybros , P.Frémeaux . 1990.** Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés

[22] **A.Groubert. 1984.** Techniques d'extraction végétale: Montpellier, pharmacie

- [23] **M.Virot , V.Tomao , C.Ginies , F.Visinoni , F.Chemat . 2008.** Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A* 1196-1197:57-64.
- [24] **M.D.Luque de Castro, A.García . 1998.** Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369:1-10.
- [25] **R.Jean , E. Rasoarahona , MG. Emile, J-P. Bianchini.** variation de la composition en acides gras des lipides du tilapia *oreochromis niloticus* (cichlidae) de madagascar :différenciation en fonction de la saison et de l'origine
- [26] **S.I. Warwrik. 1993.** Guide to wild germplasm of Brassica and Allied crops (Tribe Brassiceae, Brassicaceae): Introduction, 2end Edition,
- [27] **J. Ongilagha, A. Bala, R. Hallett, M.Gruber, J. Soroka, N. Westcott. 2003.** *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 31, 1309-1332,.
- [28] **P. Ozenda. 1977.** Flore du Sahara, Ed. CNRS, Paris, France, 250-259,
- [29] **P. Quézel, S. Santa.1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, CNRS, Paris, France, 387-398.
- [30] **A. S. Collinson. 1988.** Introduction to World Vegetation Springer. 325 pages
- [31] **Lawrence George HM. 1959** Etats-unis d'Amérique , Une introduction de taxonomie végétale
- [32] **S. Wadhwa, M. S. Panwar, A. Agrawal, N. Saini and L. N. Patidar. 2012** A review on pharmacognostical study of lepidium sativum arpb,; Vol 2 (IV)
- [33] **N.D.Raval ¹et T.N Pandya. 2011.** Étude de pharmacognosie de *Lepidium sativum* Linn (*Chandrashura*) Ayu. Jan-Mar; 32 (1): 116-119.

- [34] P. Bigoniya, C.S.Singh and A.Shukla. 2011. Pharmacognostical and physicochemical standardization of ethnopharmacologically important seeds of *Lepidium sativum* Linn. And *Wrightia tinctoria* R. Br. Indian Journal of Natural Products and Resources Vol. 2(4), pp.464-471
- [35] S.Brotonegoro and W. Wiharti, 2001. *Lepidium sativum* L. In: Van Valkenburg, J.L.C.H. and N. Bunyapraphatsara, (Eds.), Plant Resources of South- East Asia No 12 (2): Medicinal and Poisonous Plants.
- [36] U.H. Maier, H. Gundlach, M.H. Zenk. 1998. Phytochemistry 49 ,1791–1795.
- [37] W.R. Arkroyd, C. Gopalan, S.C. Balasubramanian. 1960. Nutritive Value of Indian Foods and the Planning of Satisfactory Diets, Indian Council of Medical Research, New Delhi, pp. p.64.
- [38] S. Mathews, R.S. Singhal, P.R. Kulkarni. 1993. Die Nahrung 37, 69–71.
- [39] J. Agarwal, D.L. Verma. 2011. Acad. Arena. 3 , 14–18.
- [40] R.G. Mali, M.G. Mahajan, A.A. Mehta, J. Pharm. Sci. 7 (2006) 85–88.
- [41] S.D. Pande, M. Ali, M. Iqbal, P.S. Srivastava, 1999. Die Pharm. 54 , 851–853.
- [42] S. S. Gokavi, N. G. Malleshi, and M. Guo, 2004 “Chemical composition of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds and its fractions and use of bran as a functional ingredient,” *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 59, no. 3, pp. 105–111.
- [43] V. Gil and A. j. Macleod .1979. Studies on glucosinolate degradation in *lepidium sativum* seed extracts department of chemistry, queen elizabeth college (london university), campden hill road, London
- [44] H. Ulrich, G. Heidrun, H.Meinhart. 1998. Zenk *Phytochemistry*, Vol. 49 (6), 1791-1795,
- [45] J.B.Harbone 1998 , *Phytochemical Methods- A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman and Hall Ltd, London, , 42, 129, 189, 203.

[46] C.K.Kokate, 2000 Practical Pharmacognosy, Nirali Prakashan, Pune, India, p. 107–111.

[47] F.M. Al-Jasass¹ and M.S.Al-Jasser² .2012. Chemical Composition and Fatty Acid Content of Some Spices and Herbs under Saudi Arabia Conditions The Scientific World Journal vol 6, Article ID 859892 doi:10.1100/2012/859892

[48] Rehab Farouk Mohammed Ali .2013. Preparation and characterization of protein isolate and biodiesel from garden cress seed* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Cairo University, 12613, Giza,

[49] N-ur-Rehmana, M.H.Mehmooda, K.M.Alkharfyc, A.H.Gilania. 2011. “Prokinetic and laxative activities of *Lepidium sativum* seed extract with species and tissue selective gut stimulatory actions”

[50] V. D. Prajapati, P. M. Maheriya, G. K. Jani, P. D. Patil, B. N. Patel. 2014. “*Lepidium sativum* Linn.: A current addition to the family of mucilage and its applications” Department of Pharmaceutics, S.S.R. College of Pharmacy, Saily-Silvassa Road, Saily, Silvassa, U.T. of D.N.H. 396230, India

[51] P.Soengas ,M.E. Cartea, M.Francisco, T.Sotelo, P.Velasco , 2012. New insights into the antioxidant activity of Brassica crops. Food Chem. 134, 725–733

[52] M.A.Al-yahya, J.S.Mossa, A.M.Ageel, S.Rafatullah.1994 Pharmacological and safety Evaluation studies on *Lepidium sativum* L .seeds. Phytomed 1 :155-159

[53]U. Patel, M. Kulkarni, V. Undale, and A. Bhosale. 2009 Evaluation of Diuretic Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Lepidium sativum* Garden Cress (Cruciferae) in Rats Department of Pharmacology, Seth Govind Raghunath Sable College of Pharmacy, Saswad, Pune 412301, India

[54] **M. Maghrani, N.A.Zeggwagh, J-B Michel, M. Eddouks .2005. ” Antihypertensive effect of *Lepidium sativum* L. in spontaneously hypertensive” rats a UFR PNPE P.B. 21, Errachidia 52000, Morocco b INSERM U460, CHU Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France**

[55]**M.M. Patel, G.M. Chauhan, L.D. Patel, 1987.Indian J. Hospital Pharm. 24 200–202.**

[56]**1Shama I.Y. Adam, 1Shayma A.M. Salih and Warda S. Abdelgadir.2011. “In vitro Antimicrobial Assessment of *Lepidium sativum* L. Seeds Extracts”1Department of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, School of Biochemistry,El Neelain University, Sudan**

[57] **M.Eddoaks, M.Maghrani, N.A.Zeggwagh, J.B.Michel.2005. Study of the hypoglycemic activity of *Lepidium sativum* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. J Ethnopharmacol 97: 391-395.**

[58] **D.T.H.Verhoeven., H.Verhagen, R.A.Goldbohm , P.A.Van Den Brandt, G.A.Van poppel.1997. mini-review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by Brassica vegetables. Chemico Biological Interactions, 103, 79-129.**

[59] **K.M. Nadkarni, A.K. Nadkarni. 1954. The Indian Materia Medica With AyurvedicUnani and Home remedies, third ed., Popular Prakashan, Bombay, India,pp. 736–737.**

[60] **H. Kloos, J. Ethiopian Pharm. Assoc. 2 (1976) 18–28.**

[61] **N.PArchana, A.M.Anita.2006. A Study on Clinical Efficacy of *Lepidium sativum* Seeds in Treatment of Bronchial Asthma. Iran J Pharmacol Ther 5(1): 55-59.**

[62] **J.BELLAKHDAR. 1997.Medicine arabe ancienne et savoir populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, ibis press**

[63] **R.E.Majors.2002.** Trends in Sample Preparation, *LC-GC North America* **20**, pp. 1098-1113..

[64] **D.E.Raynie. 2000.** Level I: Extraction. In: “*Encyclopedia of Separation Science*”, Edited by Wilson, I.D., Poole, C.F. ET Cooke, M., Academic Press, pp. 118-128.

[65] **Fang Li, Liuqing Yang, Ting Zhao, Jiangli Zhao, Yanmin Zou, Ye Zou, Xiangyang Wuc. 2012.** ‘ Optimization of enzymatic pretreatment for n-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology food and bioproducts processing 9 0- 87–94

[66] **W.J.Bauer, R.Badoud, J. loliger A.Etourrnand. 2010.** ‘ science et technologie des aliments : principes de chimie des constituants et de technologie des procédés ‘. PPUR presses polytechniques -720 pages

[67] **H.B. Sowbhagya , Kaul T. Purnima , Suma P. Florence , A.G. Appu Rao , P. Srinivas .2008.** ‘Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil’ Department of Protein Chemistry and Technology, Central Food Technological Research Institute, Mysore 570 020, India

[68] **K.L. Nagendra chari, D. Manasa, P. Srinivas, H.B. Sowbhagya.2013.** ‘Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)’ Department of Plantation Products, Spices and Flavour Technology, CSIR-Central Food Technological Research Institute, Mysore 570 020, India

[69] **AFNOR**, Recueil de normes: les huiles végétales. Tome 2. Monographies relatives aux huiles végétales, AFNOR, 661-663, (2000).

[70] **AOCS Official Method Ca 5a-40 (1989).** Sampling and analysis of commercial fats and oils, free fatty acids, *American Oil Chemists’ Society*, Champaign, IL, 1989.

[71] **AOCS Official Method Cd 7-58 (1989).** Sampling and analysis of commercial fats and oils, polyunsaturated acids, Ultraviolet Spectrophotometric method, *American Oil Chemists’ Society*, Champaign, IL, 1989.

[72] **AOCS Official Method Ce 2-66 (1989).** Sampling and analysis of commercial fats and oils, Preparation of Methyl esters of long-chain fatty acids, *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, 1989.

[73] Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Ed Council of Europe, p2623, 2002.

[74] **J.L.Fauchère, J..L.Avril .2002** Bactériologie générale et médicale, Ed. Ellipses, 365 pages,

[75] Anonyme, Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, 5^{ème} édition, 112, 15-16, 2008.

[76] **E. Jawetz, J.-L. Melnick, E.-A. Adelberg, 1973.**« Microbiologie médicale », Presses Université Laval, 629 p.

[77] **A.-G. Ponce, R. Fritz, C. Valle, S.-I. Roura.2003,** « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », Journal of LW- University of Technology, 36, 679-684.

[78] **G. Bartosz. 2003.**Generation of reactive oxygen species in biological systems.Comments on toxicology, 9.5- 21p

[79] **B.Pourrut . 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle. *Vicia faba*, Thèse pour l'obtention du diplôme du doctorat à l'institut national polytechnique de l'université de Toulouse, spécialité Eco toxicologie. France

[80] **A.Favier.2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Luactualit*, 11,108-115p

[81] **A.Mika, F.Minibayeva, R.Bechett, S.Luthje . 2004 .**Possible functions of extracellular peroxidases in stress – induced generation and detoxification of active oxygen species-phytochemistryre views ,3 ,173-193p.

[82] **L.Majhenic, M.S.Kerget et Z.Knez . 2007.** Antioxydant and antimicrobien activity of *Gearana* seed extract. *Vo* 104.Esseau 3.1258_1268p.

[83] J.Pokorny, N.Yanishlieva, M.Gordon.2001. Antioxydants in food. Practical applications.Woolhead publishing limited. ISBM: 185573-463x

[84] S-Y Wang., Wu J-H., Shyur L-F., Kuo Y-H. et Chang S-T.2002. « Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata ». *Holzforschung* 56 (5).

[85] G.Cao. 1997; Vinson. 1995.*In*,Kh.Kanoun . 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtuscommunis* (L.)Rayhane de la région de Tlemcen (Honaine).93p

III.8.1 Mesure des indices physiques

III.8.1.1. Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'huile végétale rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre d'un volume de 25 ml (Figure 13).



Figure 13 : Pycnomètre

III.8.1.2. Détermination du pouvoir rotatoire (AFNOR NF ISO 592:1999)

C'est l'angle, exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde de $589.3 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$, correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'huile dans des conditions déterminées de température. Le polarimètre utilisé pour la détermination du pouvoir rotatoire est illustré sur la figure.

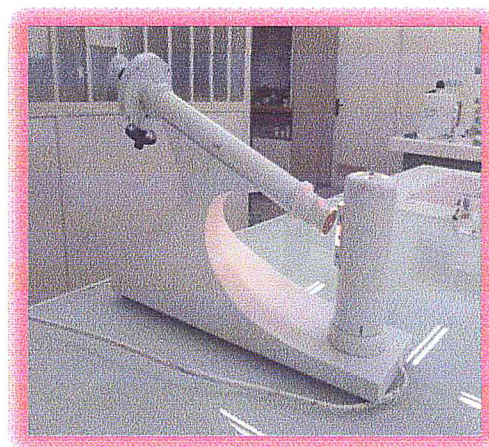


Figure 14 : Polarimètre

III.8.1.3. Détermination de l'indice de réfraction (Norme NF T 75-112)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

On mesure l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre (figure 7) à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$



Figure 15 : Réfractomètre

I_{20} : indice à 20°C.

I_t : indice à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante ou de mesure.

III.8.1.4.5. Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104:1994)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

$$IE = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - IA \quad \dots\dots (eqt 3)$$

Où :

IE : Indice d'ester ;

V_0 : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

ANNEXE 1

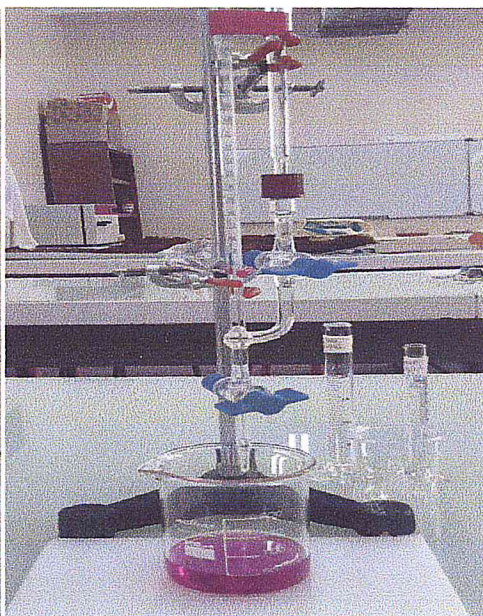
V_1 : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour la détermination ;

m : est la masse, en grammes, de l'huile végétale ;

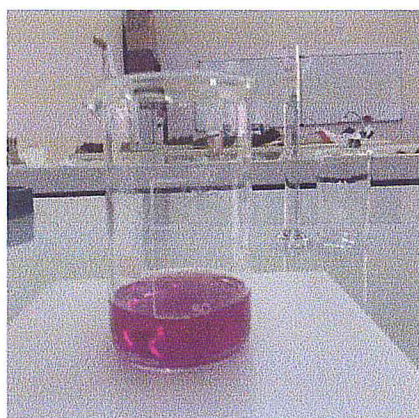
IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103



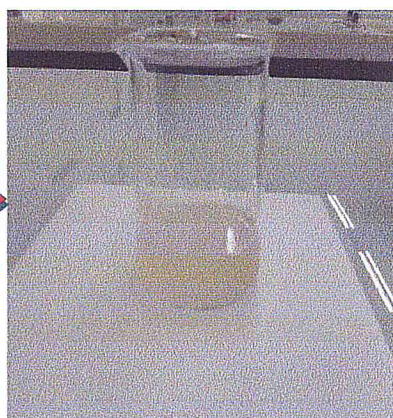
1



2



3



4

Figure 16 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester

Annexe 2

Tableau 11 : la variation de rendement en fonction de la masse végétale

La masse végétale (g) (sans broyage)	Le rendement (%)
30	0.55
70	0.45
100	0.18
150	0.16

La masse végétale (g) broyé	Le rendement (%)
30	10.98
70	11.05
100	11.12
150	11.18

Tableau 13 : variation du rendement en fonction de temps d'incubation avec prétraitement enzymatique *on considérant une masse de 30 g*

Temps d'incubation (h)	Rendement %	
	cellulase	Pectinase
2	4.01	3.67
3	4.02	3.68
4	4.03	3.69

des précision

Tableau 14 : variation de rendement en fonction de la concentration de l'enzyme

[c] % (W /W)	Rendement %	
	Cellulase	pectinase
0.05	1.31	3.56
0.1	4.01	3.67
0.5	3.66	3.45
1	3.09	2.04
2	1.62	1.56

Annexe 2

Tableau 22: le diamètre d'inhibition des souches bactériennes

Les Souches bactériennes	Diameter d'inhibition		
	A	B	C
E.coli	<8	26 mm	26 mm
S.typhi	<8	26 mm	24 mm
S.aureus	<8	40 mm	40 mm
B.subtilis	<8	16 mm	16 mm

Préparation des solutions étudiées dans l'activité anti oxydante :

Préparation de la solution alcoolique de DPPH :

Nous préparons 100ml d'une solution DPPH, en rajoutant 4 mg de poudre de DPPH à 100 ml de méthanol.

Préparation des différentes concentrations de l'extrait de la plante :

Mélanger 400mg d'huile végétale avec 100ml de méthanol → 40mg/ml (solution mère).

- Prélever 4 ml de solution mère et leur ajouter 1ml méthanol → 32mg/ml.
- Prélever 3 ml de la solution mère et leur ajouter 2ml de méthanol → 24mg/ml.
- Prélever 2 ml de la solution à (32mg/ml) et leur ajouter 2ml de méthanol → 16mg/ml.
- Prélever 2ml de la solution à (24mg /ml) et leur ajouter 4 ml de méthanol → 8mg/ml.
- Prélever 2 ml de la solution à (8mg/ml) et leur ajouter 2ml de méthanol → 4mg/ml.

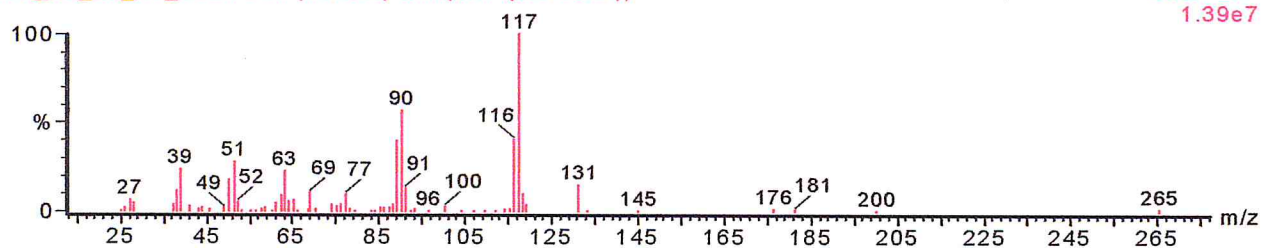
ANNEXE 3

A = t_R (10.863 min)

, 30-Jul-2014 + 09:31:13

HE_01_30_07_2014 981 (10.863) Cm (981-(963+995))

Scan EI+
1.39e7

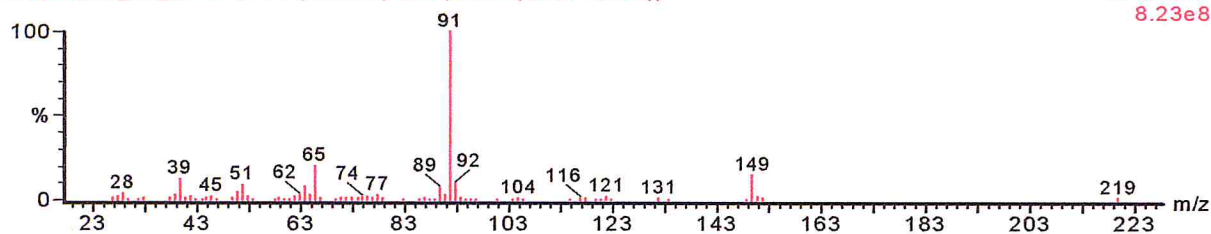


B = t_R (t = 18.078 min)

, 30-Jul-2014 + 09:31:13

HE_01_30_07_2014 2407 (18.078) Cm (2407-(2383+2425))

Scan EI+
8.23e8

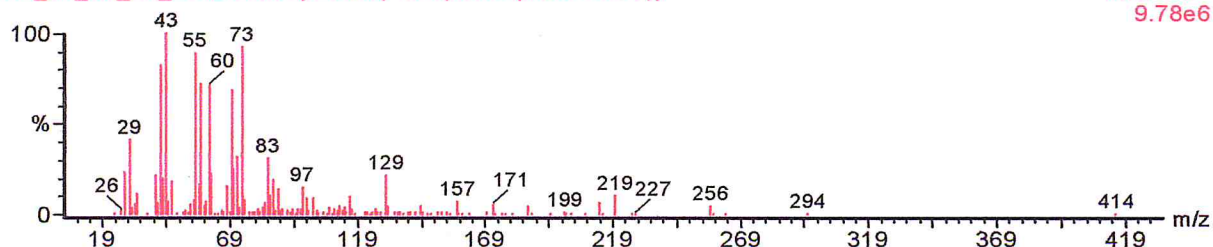


C = (t = 34.562 min)

, 30-Jul-2014 + 09:31:13

HE_01_30_07_2014 5665 (34.562) Cm (5665-(5648+5679))

Scan EI+
9.78e6

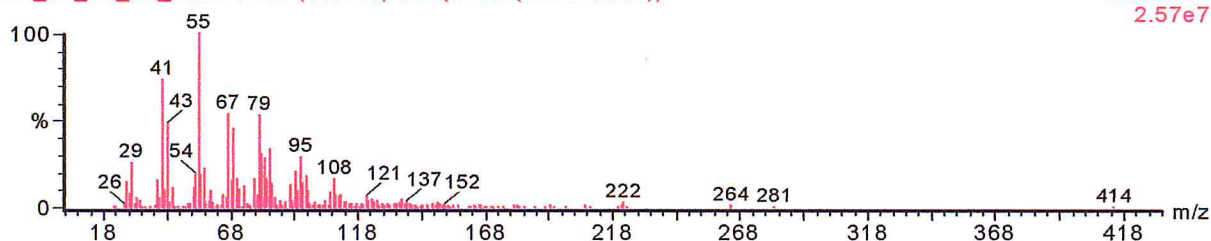


D = (t = 38.718 min)

, 30-Jul-2014 + 09:31:13

HE_01_30_07_2014 6486 (38.718) Cm (6486-(6471+6500))

Scan EI+
2.57e7



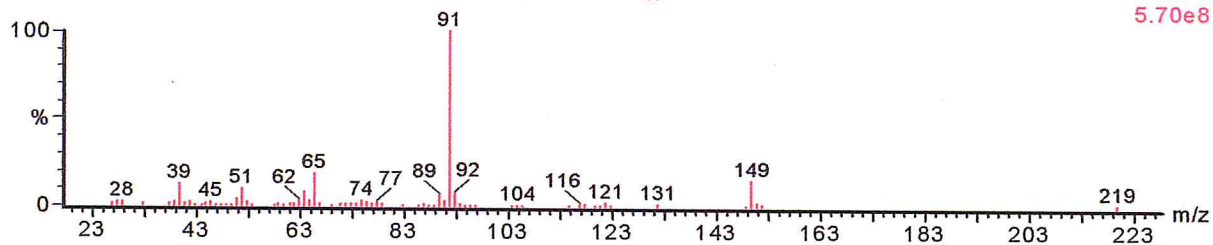
ANNEXE 3

A= t = 17.405 min

HE_02_30_07_2014 2274 (17.405) Cm (2274-(2267+2281))

, 30-Jul-2014 + 11:06:13

Scan EI+
5.70e8

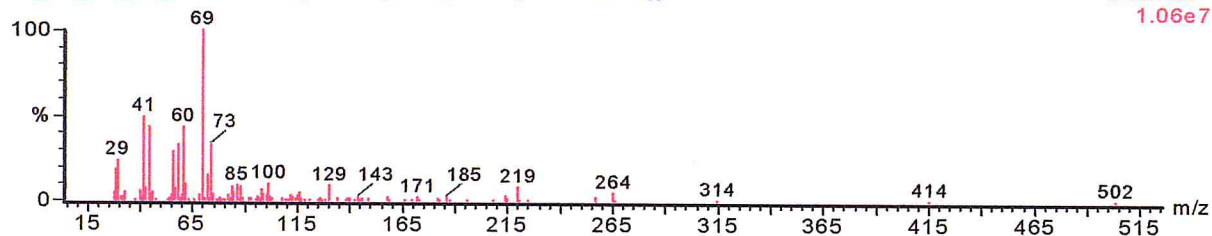


B= t = 33.884 min

HE_02_30_07_2014 5531 (33.884) Cm (5531-(5515+5548))

, 30-Jul-2014 + 11:06:13

Scan EI+
1.06e7



C= t = 38.058 min

HE_02_30_07_2014 6356 (38.058) Cm (6356-(6326+6373))

, 30-Jul-2014 + 11:06:13

Scan EI+
2.49e7

