



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et

Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



*Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biotechnologie Et Agro-Écologie*

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Hydrolyse Enzymatique Des Protéines De graines de courge
Cucurbita PEPO ; Études de l'activité Antioxydant et
Antimicrobienne Des Hydrolysats Protéiques**

Réalisé par :

Mlle. Bouacha Sabrina

&

Mlle. Zaida Lina

Devant les membres du jury composé de :

- | | | | |
|---------------------|------------|-------|---------------------|
| - Mme DJAZOULI ALIM | Professeur | USBD1 | <i>Présidente</i> |
| - Mme A. HADJZIANE | Professeur | USBD1 | <i>Examinatrice</i> |
| - Mme K. ALILECHE | MRB | CRAPC | <i>Promotrice</i> |

BLIDA.2021-2022

Remerciements

Nous remercions en premier lieu, Dieu le Tout Puissant qui nous a guidés sur le droit chemin et nous a donné la santé ; le courage et la volonté d'affronter les difficultés rencontrées et aboutir à la réalisation de ce travail.

*Nous tenons à remercier chaleureusement notre promotrice **Dr . Allileche** Maitre de recherche classe B au niveau de Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques (**CRAPC**) pour avoir encadrée et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ses précieux conseils, ses compétences scientifiques, et sa gentillesse durant toute la période du travail*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à **Mme DJazouli Alim** professeur à l'université SAAD Dahleb Blida 1 pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury .*

*On remercie également Mme **HADJ.ZIANE** Professeur à l'Université SAAD Dahleb Blida 1 d'avoir accepté d'examiner notre travail*

*Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux **Pr. BECHARI Khaldoun** (Directeur de Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques) et **pr. Yousfi** (Directeur de L'Hôpital Boufarik) pour ces contributions à la réalisation du travail.*

*Merci également à **DR. LASSAS .k** chef du laboratoire de microbiologie a (l'hôpital BOUFARIK ; service d'infectiologie) pour, ses précieux conseils ; son aide, et sa gentillesse et a toute l'équipe du laboratoire de microbiologie*

Nos reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

À **ma charmante maman** Pour son amour, ses soins, son soutien et son encouragement tout au long de ma vie. Sans son soutien pendant les années de mon étude, je ne serais pas ici aujourd'hui, je vous promets que vos sacrifices ne seront pas vains. Merci pour tout ce que tu as fait et continue de faire, tu es la meilleure maman.

À **mon cher père** que j'aime très fort, qui me soutien et donne les efforts à tout moment. Tu étais le meilleur papa et sera toujours...

À mes chères sœurs **SELMA ,FARAH ,RAFAH** , que je vous aime trop....

À mon petit frère **MOHAMED YOUNES** , mon bébé d'amour ,la bougie de ma vie ..

Un spécial dédicace a ma charmante amie **SARA** Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

À mes chères amies **AMINA ,YASMINE , KAOUTHER ,NADJOUA** , pour les bons moments qu'on a passé ensemble,et mon binôme **Sabrina**

À toute **ma famille** , Je n'oublierais jamais votre soutien.

À tous les gens qui m'ont fait ce que je suis aujourd'hui et ceux qui n'ont jamais changé.

À tous ceux que j'aime.

Merci !

Lina

Dédicace

Je rends grâce a mon dieu de m'avoir donné le courage ; la volonté et la santé pour terminer mon cursus universitaire

Je dédie ce travail

À ma raison de vivre, le support de ma vie mes parent **Ahmed** et **Mounira** pour l'éducation que vous m'avez transmise, l'Amour que vous m'avez porté pour toutes les fois où vous m'avez poussé vers la réussite cet grâce a vous que j'ai fait se mémoire que Allah vous accord long vie dans la santé et le bonheur

À mes sœurs d'Amour

Amira , Yasmine , Rania et mon adorable petite sœur

Malak

À mes tante adorées

Chrifa ; Houria, Souad et toute ma famille

À mes très chère amis **Yasmine, Amina, Kouather, Nadjoua, Nadhir** et mon binôme **Lina** .

À la mémoire de mes grand-mère **Fadhila et Malika** et mon grand Père **Mohamed** vous rester dans mon cœur à jamais, que dieu vous accueillir dans son vaste paradis.

Sabrina

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Listes des tableaux

Listes des abréviations

Résumé

Introduction

Chapitre I :	3
Partie 01 : généralité sur la courge	4
I.1.Historique	3
I.2.Description botanique	4
I.3.Classification des courges	4
I.3.1.Cucurbita Pepo	7
I.4.Les graines de courge	8
I.5.Composition et valeur nutritionnelle des grains et de courge	8
I.6.Les constituants d'intérêt de la courge	9
I.6.1.Les caroténoïdes	9
I.6.2.Les polyphénols	10
I.7.L'effet thérapeutique	11
I.7.1.Effets hypolipémiants	11
I.7.2.Effets antimicrobiens	12
I.7.3.Effets hypertenseurs et protecteurs du cœur	12
I.7.4.Effets anti-carcinogènes	13
I.7.5.Effets antidiabétiques	14
I.1.Généralité	15
I.2.L'Hydrolyse	16
I.2.1.Hydrolyse chimique	16
I.2.2.Hydrolyse enzymatique	17
I.3.Les enzymes protéolytiques	18
I.4.Mécanismes et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique	21
I.5.Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique	22
I.6. Les peptides bioactifs	25
I.1.Activité antioxydant	28
I.1.1.Stress oxydatif	28
I.1.2.Antioxydants	29
I.1.3.Méthodes de mesure de la capacité antioxydant	32
I.2.Activité Antimicrobienne	33
I.1.1.Les principales substances antimicrobiennes	33
I.1.2.Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne	33
Chapitre II :	35

II .1.Matériel végétale	35
II .2.Matériel enzymatique	36
II .3.Microorganisme utilisé	36
II .5.Procéder d'obtention de poudre des grains de courge	38
II .6.Caractérisation physico-biochimique de la poudre des graines de courge	39
II .7.Analyse spectroscopique des grains	43
II .8.Hydrolyse enzymatique des protéines des grains de courge	45
II .9.Les activités biologiques des hydrolysats	47
II .9.1.Activité antioxydant	47
II.9.2. Activité antimicrobienne	48
Chapitre III : Résultats.....	52
III .1.Résultats de la caractérisation physico-biochimique des grains de courge	52
III .2.Résultat des analyses spectroscopique	56
III .3.Résultat d'hydrolyse enzymatique des grains de courge	59
III .3.1.Evolution de Degré d'hydrolyse	59
Chapitre IV: Discussion.....	66
Annexes.....	84

Listes des figures

Liste des figures

Liste des figures	page
Figure 01 : la production de la courge au niveau mondial (cucurbita pepo)Croissance, tendances, et prévisions (2022-2027)	03
Figure 02 : structure tridimensionnelle de la trypsine (D'après Gerlet et Gasmani 1993)	20
Figure 03 : triade de cite catalytique de la trypsine (d'après E.jaspard 2011)... ..	20
Figure 04 : sites de clivage trypsique des liaisons peptidiques lors de l'hydrolys Enzymatique.....	21
Figure 05: Variation de la vitesse de réactions enzymatique en fonction du Ph et T° (Godon, 1996)	24
Figure 06 : fonctions des peptides bioactifs (inspire (de Silva et Malcata, 2004).....	26
Figure 07 : Représentation d'un radical libre (Dacosta 2003)	29
Figure 08 : Réactions clés des défenses enzymatiques antioxydantes (favier, 2003)... ..	30
Figure 09 : structure chimique de bêta-carotènes d'après (Rahman ,2007).....	31
Figure 10 : Structure de base des flavonoïde (Krishna et al., 2001)	31
Figure 11: Réaction du test DPPH d'après (José Teixeira et al ; 2013).....	32
Figure 12 : principe de l'antibiogramme (Alain Gallien 2012)	34
Figure 13 : les grains de courge (photo originale ,2022)	36
Figure 14 : schéma du dispositif expérimental utilise (travail encadre).....	37
Figure 15: séchage des grains a l'air libre et a l'étuve	38
Figure 16 : Procéder d'obtention de poudre des grains de courge	38
Figure 17 : Spectrophotomètre appareil (photo originale,2022)	41
Figure 18: dispositif Soxhlet (A) , Rotavapeur (B) (photo originale,2022).....	42
Figure 19 : dispositif de Kjeldahl , (photo originale ,2022).....	43
Figure 20: Dispositif de l'hydrolyse enzymatique des protéines des graines de courge, (photos originales,2022)	45
Figure 21 : Lyophilisation des hydrolysats enzymatique (photos originales , 2022).....	47
Figure 22: Résultat du test de piégeage des radicaux libres le DPPH.....	48
Figure 23 : Les milieux de culture préparés ,(photo originale,2022)	49

Liste des figures

Figure 24 : Stérilisation des milieux de culture et les tubes à essai à l'autoclave.....	49
Figure 25 : Les dilutions d'extrait préparés ,(photos originales,2022).....	50
Figure 26 : L'ensemencement des souches bactériennes dans la gélose.....	50
Figure 27: dépôt des disques sur la surface de la gélose inoculée ,(photo originale,2022).....	51
Figure 28 : Teneur moyenne en eau % des grains de courge <i>Cucurbita Pepo</i>	52
Figure 29 : teneur moyenne en Cendre des grains de courge <i>Cucurbita Pepo</i>	53
Figure 30 : la courbe d'étalonnage de glucose.....	54
Fig 31 : Teneur moyenne en sucre de la grain de courge <i>cucurbita Pepo</i>	54
Figure 32 : Teneur moyenne en lipide Totaux des grains de courge <i>Cucurbita Pepo</i>	55
Figure 33: Teneur moyenne en protéine des grains de courge <i>cucurbita Pepo</i>	56
Figure 34: spectres IR des grains de courge <i>cucurbita Pepo</i> avant l'hydrolyse enzymatique.....	56
Figure 34 : spectre IR des hydrolysats protéique des grains de courge <i>cucurbita Pepo</i> après hydrolyse enzymatique totale	57
Figure 35 : évolution du degré d'hydrolyse des protéines de grains de courge <i>cucurbita Pepo</i> avec la Trypsine dans les conditions, optimale T 40 C°, pH 8, E / S 1 % en fonction de temps .	59
Figure 36 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.et de l'hydrolysat	60
Figure 37 : Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'hydrolysat protéique par la méthode de diffusion en disque	(63-65)

Liste des tableaux

Liste des tableaux	page
Tableau 01 : Classifications classique et phylogénétique de la courge (Vanier, 2007).....	05
Tableau 2 : Les principales espèces et variétés de la courge (Polese, 2006).....	06
Tableau 3 : Les caractères distinctifs d'espèces (<i>Cucurbita pepo</i>) (Gagnon et al 2007)...	07
Tableau 4 : Composition des graines de courge dans 100g.....	09
Tableau 5 : Composition de la courge dans 100g (Adrian et al., 1995).....	09
Tableau06 : spécificité de quelques protéases (Rao et al., 1998).....	19
Tableaux 07 : les constituant minérale de grains de la courge <i>Cucurbita Pepo</i> déterminer par FRX.....	58
Tableau 08 : Valeurs des IC50 des différents hydrolysats protéiques des grains de courge..	61
Tableau 09 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibition obtenus.....	62

Liste des abréviations

AA : acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALT: alanine aminotransférase

Anti-ACE: Angiotensin I - Converting Enzyme

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BES: électrons rétrodiffusées

CAT : Chloramphénicol acétyltransférase

CRAPC : de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico Chimiques

CS $\alpha\beta$: Cysteine-stabilized α -helix β -sheet

DH : Degré d'hydrolyse

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

E. coli : Escherichia coli

ECCI : Electron Channeling Contrast Imaging

FRAP : ferric-reducing antioxidant power

FRX : fluorescence X

GPx : Glutathion peroxydase

GSH: Growth stimulating hormone

H₂SO₄: Acide sulfurique.

IR : infrarouge

LYS : Trypsinogène

MAP11 : la protéine 11 associée aux microtubules

MAP2 : la protéine 2 associée aux microtubules

MAP4 : la protéine 4 associée aux microtubules

MDA: malondialdéhyde et enzyme antioxydante

MEB : microscopie électronique a balayage

MET : microscope électronique en transmission

Liste des abbreviations

MUFA : Les acides gras mono-insaturés

NO : Monoxyde d'azote

ORAC : oxygen radical 24absorbance capacity

PAMS : Peptides antimicrobiens

PUFA : Les acides gras polyinsaturés

RBC : Red blood cell

ROS :React Oxyg Species

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

SE : électrons secondaires

SOD : superoxyde dismutase

TA diastolique : Tension artérielle

TEMED : Tetramethylethylenediamine

المخلص

لعدة عقود ركزت العديد من الدراسات اهتمامهم على الأنشطة الحيوية لمكونات القرع من الكروتينويدات و البروتينات وصولاً للبيتيدات، الهدف الرئيسي من هذا العمل هو اثبات انه من خلال التحلل المائي الانزيمي لبروتينات بذور

القرع *Cucurbita Pepo* .

بواسطة التريسين يمكن إطلاق وتركيز الببتيدات النشطة بيولوجياً لظهار تقييم القدرة المضادة للأكسدة من التحلل الإنزيمي الكلي الذي تم إجراؤه باستخدام طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH. نشاطا كبيرا يمثلته IC 50 الخاص به والذي يبلغ 0.11 ± 8.1 مجم / مل ، أعلى من ذلك المسجل من حمض الأسكوربيك (0.19 ± 0.02 IC50 مجم / مل). يتم التعبير عن نتائج النشاط المضاد للميكروبات من خلال قطر مناطق التثبيط التي أظهرت نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد معظم السلالات من خلال نشاط مثبط كبير ضد السلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها ؛ يبدو أن: سلالة *pseudomonas sp* هي الأكثر حساسية للتحلل الكلي مع قطر تثبيط 2.12 ± 56 مم. النتائج التي تم الحصول عليها تكشف عن تأثير مضاد للميكروبات ومضاد للأكسدة من التحلل الإنزيمي وبالتالي هذه النتائج أثبتت فعالية المضاد الميكروبي قوة التحلل الإنزيمي ضد الجراثيم المسببة للأمراض. أيضاً، تمكنا من اكتشاف الخصائص البيولوجية للتطبيق العلاجي.

Abstract

For several decades, many studies have focused their attention on bioactivities of pumpkin constituents, from carotenoids to protein through peptides. The main objective of this work was to demonstrate that from the enzymatic hydrolysis of *Cucurbita Pepo* squash grain proteins by trypsin, it was possible to release and concentrate biologically active peptides.

The evaluation of the antioxidant power of the total enzymatic hydrolyzate which was carried out using the method of trapping the free radical DPPH showed considerable activity, represented by its IC₅₀ which is of the order of 8.1 ± 0.11 mg / ml, higher than that recorded of ascorbic acid (IC₅₀ = 0.19 ± 0.02 mg/ml). The results of the antimicrobial activity are expressed by the diameter of the zones inhibitions which showed antibacterial activity against most strains by considerable inhibitory activity against the pathogenic strains tested; he emerges that: the *Pseudomonas* sp strain is the most sensitive to the total hydrolyzate with an inhibition diameter of 56 ± 2.12 mm The results obtained reveal a significant antimicrobial and antioxidant effect of the hydrolyzate enzymatic and therefore these results have proven the effectiveness of the antimicrobial power of enzymatic hydrolyzate against pathogenic germs. Also, we were able to detect properties biologics for therapeutic application.

Résumé

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses recherches ont porté leur attention sur les bioactivités des constituants du courge, depuis les caroténoïde jusqu'aux protéines, en passant par les peptides. L'objectif principal de ce travail était de démontrer qu'à partir de l'hydrolyse enzymatique de protéines de grains de la courge *Cucurbita Pepo* par la Trypsine, il était possible de libérer et de concentrer les peptides biologiquement actifs

L'évaluation du pouvoir antioxydant des 'hydrolysats enzymatiques totales qui a été réalisée en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré une activité considérable, représentée par son IC₅₀ qui est de l'ordre 8.1 ± 0.11 mg/ml, supérieure à celle enregistrée de l'acide ascorbique (IC₅₀= $0,19 \pm 0,02$ mg/ml).

Les résultats de l'activité antimicrobienne sont exprimés par le diamètre des zones d'inhibitions qui ont montré une activité antibactérienne contre la plupart des souches par une activité inhibitrice considérable vis-à-vis des souches pathogènes testées ; il ressort que : la souche *Pseudomonas* est la plus sensible vis-à-vis l'hydrolysat total avec un diamètre d'inhibition de $56 \pm 2,12$ mm

Les résultats obtenus révèlent un effet antimicrobien et antioxydant important de l'hydrolysat enzymatique et donc ces résultats ont prouvé l'efficacité du pouvoir antimicrobien d'hydrolysat enzymatique contre les germes pathogènes. Aussi, on a pu déceler des propriétés biologiques pour une application thérapeutique.

Mots clés : grains de courge (*Cucurbita Pepo*), Hydrolyse enzymatique, Trypsine, Hydrolysat protéique, DPPH, activité antioxydant et antimicrobienne,

Introduction

Depuis l'Antiquité, de nombreux médicaments à base de plantes ont été recommandés pour le traitement de diverses maladies. Les médicaments traditionnels ont une importance particulière car ils ont été testés sur une longue période, L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (**OMS, 2002**) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**Famsworth et al., 1985; Fleurentin et Pelt, 1990**).

L'OMS a également recommandé le lancement d'études pour identifier et caractériser de nouveaux agents thérapeutiques efficaces à base de plantes traditionnellement connues. Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel (**Famsworth et coll, 1985; Cordell et Colvard, 2005**). Cependant, l'évaluation des propriétés Phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira da Silva, 2004**). Il est donc important d'orienter les recherches vers le criblage de nouvelles molécules bioactives à partir des végétaux qui ont toujours servi de base à l'élaboration de nouveaux médicaments (**Oussou et al., 2010**).

La courge Cucurbita pepo appartient à la famille des Cucurbitaceae et du genre Cucurbita; issue des zones tropicales et subtropicales telles que le Mexique et l'Amérique du Sud (**Quasim et al., 2005, Azizah et al., 2009**) est l'une des plantes comestibles les plus connues qui possède des propriétés médicinales importantes en raison de la présence de substances comestibles naturelles uniques. Il contient plusieurs phyto-constituants appartenant aux catégories des alcaloïdes, caroténoïde des polyphénol des flavonoïdes et des acides palmitique, oléique et linoléique, ces grains est considéré comme la partie la plus importante du courge car elle contient divers composant biologiquement actif tels que les protéines ; acides aminés essentiels les polysaccharides, les vitamines et les acides gras

Ces dernières années les peptides bioactifs dérivés des protéines alimentaires d'origine végétale ont été bien étudiés pour déterminer leur utilisation potentielle et leur effet sur les principaux systèmes du corps humain (systèmes cardiovasculaire, immunitaire, nerveux et gastro-intestinal.) pour cela les progrès technologiques récents ont suscité un grand intérêt pour l'utilisation de peptides biologiquement actifs issus des grains de courge (**Castro et al 2015**).

Parmi les techniques modernes de valorisation des protéines végétale bioactif se trouve l'hydrolyse enzymatique par l'emploi d'enzymes alimentaires, notamment les protéases, connaît un succès considérable. Ce procédé permet une meilleure solubilisation des protéines sous forme d'hydrolysats protéiques. Les hydrolysats issus de la protéolyse enzymatique des protéines végétales sont des mélanges complexes contenant des peptides possède des propriétés physico-chimiques varier et une bioactivité particulière supérieur. aux protéines natives (**Liceaga et Li-Chan, 1999 ; Kristinsson et Rasco, 2000 a, 2000 b ; Liaset et al., 2000 ; 2003**).

En effet, certaines études ont démontré que lorsque les protéines des graines végétale comme grain de lin sont hydrolysées sous forme de peptides, présentent une bioactivités déférentes (**Doyen et al., 2014**). Il a été signalé que des hydrolysat de protéine peuvent agir comme piègeurs des radicaux libre et pourrait améliorer le system enzymatique antioxydant (**Athmani et al 2015 ben khaled et al 2012 you et al 2011 parathasarathy et al 2000**)

Dans le présent travail, nous chercherons à mettre en évidence et à démontrer ce que le fruit de la courge Cucurbita moschata recèle comme propriétés biologiques à effet santé. dans un premier temps, une caractérisation physico chimique de la poudre de grains de courge comme l'humidité , les cendres , les lipids, les sucres et les protéines . Dans une deuxième temps, une hydrolyse enzymatique de la poudre pour étudier l'activité antioxydante et antimicrobienne des 'hydrolysats protéiques obtenues.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

Partie 01 :
généralité sur
la courge

I.1..Historique

On croit que les courges ont été domestiquées en Mésopotamie voilà 8,000 ans. Au fil des siècles, on a vu apparaître de multiples variétés qui furent cumulées en nomenclature botanique (Cucurbitales) par Carl Linnaeus dans son volume “Genera Plantarum” au milieu du 16ème siècle. Elle comprend plus de 800 espèces réparties en 130 genres dont la plus importante; la cucurbitacée, comprenant les citrouilles, les courges, les melons et les concombres.

Durant tout ce temps, la culture de courges se faisait entre les tropiques du Cancer et du Capricorne. Ce n'est que depuis le tournant du XIX siècle ou plus précisément depuis l'arrivée des marchands de semences et leurs catalogues que la culture s'est répandue en Amérique du Nord.

Leur succès a permis de stimuler la génétique naturelle pour qu'elle s'adapte au climat plus nordique. Sans leurs travaux acharnés, nul doute que les courges seraient exclusivement cultivées au Mexique aujourd'hui! Ces quelques marchands de semences ont eu une influence marquée dans l'adoption des variétés de pollinisation ouverte (ancestrales) qui ont survécus à ce jour.

La plupart des semences de courges ancestrales cultivées au Québec proviennent de cette époque. Les Gill Brothers Seed Company d'Oregon, Shaker Seed Company de N.Y., B.K Bliss and Son's de N.Y., W. Atlee Burpee Seed Company de Philadelphie (La plus importante au monde en ce temps-là) et Burgess Brothers, du Michigan ont accompli du bon boulot...

Aussi, la sophistication culinaire dans la cuisson et l'affinage des courges vient essentiellement du nord-ouest Américain. Ceci est dû à des efforts de sélection de semences à pollinisation ouverte qui ont vu tellement plus de résultats qu'ailleurs.

En 2018 le premier producteur mondial de courge était la Chine avec 8.133.734 tonnes, le deuxième l'Inde avec 5.569.809 tonnes et le troisième l'Ukraine avec 1.338.000 tonnes

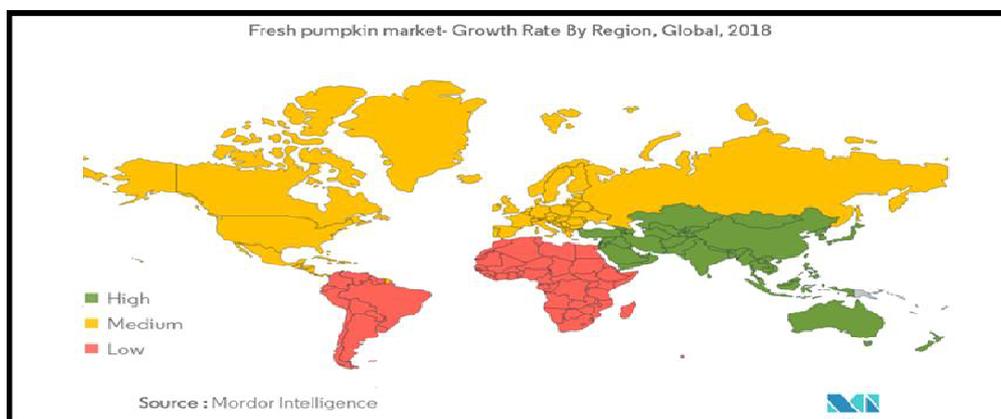


Figure 01 : la production de la courge au niveau mondial (cucurbita pepo). Croissance, tendances, et prévisions (2022-2027)

I.2.Description botanique

L'espèce cucurbita est une plante herbacée annuelle à longues tiges, rampantes, qui s'accrochent par des vrilles à tout support. Toute la plante est couverte de poils souples, non épineux (Carvalho et al., 2012). Les tiges produisent des racines adventices à chaque entre nœud. Si la plante grimpe sur un support, ces racines sont aériennes et peuvent atteindre plus d'un mètre de long en climat chaud et humide (Junxin et al., 2011).

Les feuilles sont grandes, entières, à nervation palmée, formant cinq lobes peu marqués mais présentant des angles nets. Elles peuvent atteindre cinquante centimètres de diamètre et sont veloutées, de couleur verte plus ou moins marbrée de blanc (selon les variétés et les conditions de culture) (Noelia et al., 2011). Les fleurs à sexes séparés (plante monoïque) ont des couleurs variant du jaune à l'orange (Escalada et al., 2009)

Les fruits sont en général de forme allongée, avec une extrémité renflée en massue ou en forme de bouteille, parfois sphérique, plus aplatie ou côtelée (Fissore et al., 2009). Leur couleur est aussi très variable : vert sombre, orangé, crème... À maturité, ils sont revêtus d'une poussière glauque caractéristique (Gliemmo et al., 2009)

I.3.Classification des courges

Les courges sont regroupées en deux grandes catégories :

les courges d'été et les courges d'hiver. Cette classification repose sur la durée de conservation, les courges d'été se conservent peu de temps quant aux courges d'hiver leur durée de conservation est plus longue, ceci est dû à l'épaisseur de leur peau (Pahud et al., 2006). Les courges appartiennent au genre Cucurbita, qui comprend plusieurs espèces d'été et d'hiver. A côté des espèces sauvages, amères et impropres à la consommation, six espèces comestibles ont été identifiées :

- Cucurbita ficifolia (courge à feuilles de figuier)
- Cucurbita argyrosperma ou mixa (chayote)
- Telfairia occidentalis Hook
- Cucurbita maxima (potiron)
- Cucurbita moschata (courge musquée)
- Cucurbita pepo (citrouille) (Caili et al., 2006)

Le tableau suivant représente les classifications classiques et phylogénétiques de la courge.

Tableau 01 : Classifications classique et phylogénétique de la courge (**Vanier, 2007**).

Classification Classique	
Règne	Plantae
Division	Manoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Famille	Cucurbitaceae
Genre	Cucurbita
Espèces	Voir variétés
Classification phylogénétique	
Ordre	Cucurbitales
Famille	Cucurbitales

Les trois dernières (*C.moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*) représentent les espèce les plus cultivées et abondantes dans le monde (**Caili et al., 2006**).

Le tableau 02 illustre les principales espèces et variétés de la courge

Tableau 2 : Les principales espèces et variétés de la courge (Polese, 2006)

Espèce	Variétés	Image
<i>Cucurbita moschata</i>	Courge musquée (Courge Butternut)	
	Musquée de Provence	
<i>Cucurbita pepo</i>	Citrouille	
	Pâtisson	
	Courge spaghetti	
<i>Cucurbita maxima</i>	Potiron	
	Potimarron	

La présence de nombreuses variétés et espèces du genre *Cucurbita* nous a conduit à choisir l'espèces de (*Cucurbita pepo*), pour réaliser cette présente étude.

I.3.1.Cucurbita Pepo

Cucurbita pepo est une espèce très répandue, elle renferme plusieurs variétés voire la courgette, la courge musqué , Butternut) etc. La plante entière porte des piquants et les feuilles sont de couleur verte unie ou tachetées de clair, découpées en 5 lobes aigus. Ces courges peuvent être coureuses ou non.

Le pédoncule devient très dur à maturité, mais il est marqué de cinq côtes longitudinales. Souvent, ces côtes se prolongent sur le fruit ou continuent sur ce dernier avec une couleur différente (Polese, 2006).

Pour distinguer entre les espèces de courges, des critères d'identification ont été établis voir la forme et la couleur des feuilles, pédoncule et graines (nombre et couleur) (Gagnon et al., 2007).

Tableau 3: Les caractères distinctifs d'espèces (*Cucurbita pepo*) (Gagnon et al 2007)

Espèces	Feuilles	Fruit	Graines
<i>Cucurbita pepo</i>	 <p>Profondément découpées marbrées de blanc</p>	 <p>(photo original)</p>	 <p>Petites (7 à 20 mm) beiges et lisses</p>

En Algérie, les conditions climatiques et la nature des sols sont très favorables pour cultiver toutes les espèces de courge, leur culture couvre une superficie de 8010 hectares avec une production totale de 875 410 quintaux (Benachour, 2008).

Particulièrement en Tipaza, plusieurs variétés et espèces de la courge ont été identifiées en se basant sur les critères cités précédemment, la majorité des variétés caractérisées se rattachent aux espèces suivantes:

- Variété (*Cucurbita maxima*).
- Variété (*Cucurbita moschata*).
- Variété (*Cucurbita pepo*).

Il est possible que d'autres espèces et variétés puissent exister, mais les plus retrouvées et cultivées dans cette région, sont mentionnées ci dessus.

I.4.Les graines de courge

La graine de courge provient de la courge à huile de la variété Lady Godiva, dans la plupart des cas. Cette variété appartient à l'espèce *Cucurbita pepo*

En Europe, quatre variétés de courges sont cultivées pour leurs graines : la courge de Siam, le potiron, la citrouille et la courge musquée. Il existe en réalité près de huit cents (800) variétés différentes. La graine se présente sous une couleur vert foncé. Son enveloppe est très fine et se mange de bien des façons : nature, moulue, hachée, grillée, etc. Le plus souvent, les graines de courges assaisonnent les salades, les mueslis ou les soupes. On les intègre aussi aux mélanges de fruits secs, aux poêlées de légumes ou encore, aux recettes de pain.

I.5.Composition et valeur nutritionnelle des grains et de courge

La courge C'est une culture végétale traditionnelle ayant une grande importance nutritionnelle et économique, cultivée pour leurs graines, fruits immatures et matures (**Quasim et al., 2005, Azizah et al.,2009**).

Les graines de courge contiennent 30 à 50% d'huile grasse, elle-même composée d'acide linoléique polyinsaturé (50 à 64%), d'acide oléique monoinsaturé (35%), d'acide palmitique (env. 10%) et d'acide stéarique (env. 5%). Les autres composants sont les protéines (25 à 40%), les glucides (6 à 10%), les fibres brutes (fibres alimentaires, 4 à 6%), les minéraux tels que le potassium, le calcium, le magnésium et les oligoéléments dont le zinc, le manganèse, le cuivre et le sélénium (0,03%). S'ajoutent des phytostérols– substances similaires au cholestérol ayant des propriétés semblables à celles des hormones – des isoflavones, des vitamines C et E, les cucurbitacées contiennent des substances amères (cucurbitacine) très toxiques. Ne pas consommer le légume (courge, concombre...) s'il a un goût très amer (**Lendenmann, 2013 ; Wolf et Miller, 2008**).

Les molécules bioactives les plus abondantes dans la courge sont les caroténoïdes principale responsable de la couleur rouge brun de l'huile des graines de courges et les polyphénols (Gliemmo et al., 2009).

Tableau 4 : Composition des graines de courge dans 100g.

Composants	Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g	Composants	Valeur nutritionnelle moyennes pour 100 g
Glucide (g)	1,29	Protéine (g)	29,84
Amidon (g)	0,74	Lipides (g)	39,05
Sucre (g)	1,29	Eau (g)	2,03
Fibre alimentaire (g)	6,50	Cendres totales (g)	4,37

Tableau 5 : Composition de la courge dans 100g (Adrian et al., 1995).

Composition	Quantité
Eau (g)	91,5
Protéines (g)	1
Lipides (g)	Traces
Glucides totaux (g)	6,6
Cendres (g)	0,8
Énergie (K cal)	25

I.6.Les constituants d'intérêt de la courge

I.6.1.Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments colorés dont la couleur varie du jaune au rouge. Environ 700 caroténoïdes ont été isolés à partir de produits naturels (Britton et al., 2008) mais seulement une vingtaine sont détectables dans les tissus ou le sérum humain. Ils sont

naturellement synthétisés par des plantes, certains champignons, des algues et quelques bactéries (Liu et al., 2000; Astray et al., 2009; Achir et al., 2010).

Chez les plantes et les algues qui contiennent des caroténoïdes, ceux-ci se trouvent dans les chloroplastes et les chromoplastes. Ils ont deux rôles principaux : l'absorption de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse et la protection de la chlorophylle contre les dommages causés par la lumière (Bartley et al., 1995). Chez les animaux, les caroténoïdes ne peuvent pas être synthétisés, ils sont simplement absorbés par l'alimentation même quand ils confèrent la couleur à l'animal comme c'est le cas de certains crustacés, insectes, poissons et oiseaux.

Ces pigments sont d'abord connus pour la convertibilité de certains d'entre eux en vitamine A, une vitamine essentielle, indispensable à la préservation des tissus épithéliaux des yeux et au système immunitaire (Bendich et al., 1986).

Les caroténoïdes sont également de puissants antioxydants capables de protéger les cellules vivantes contre des attaques de radicaux libres et des dommages oxydatifs par une action anti-mutagène, anticlastogène et anti-carcinogène (Burton et al., 1984; Bendich et al., 1986; Fakourelis et al., 1987; Park 1994; Mueller et al., 2011). Ils ralentissent également le développement des tumeurs cancéreuses (Palozza et al., 1997; Wang et al., 1999).

Dans l'alimentation, ils sont non seulement utilisés comme colorants alimentaires mais aussi ajoutés dans certains régimes fonctionnels afin d'abaisser la mortalité causée par certaines maladies (Pierce et al., 2006). Parmi les caroténoïdes, le lycopène et le β -carotène, pigments de couleur rouge et orange, sont très abondants dans les plantes et les fruits. Ils sont également absorbés par le corps humain depuis l'alimentation et possèdent pour celui-ci des propriétés avantageuses.

I.6.2. Les polyphénols

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (Gee et Johnson, 2001). Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes (El Gharras, 2009).

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**). De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (**Brown et al., 1998**), les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (Paganga et constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les composés phénoliques apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme (**Gee et Johnson, 2001**). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (**Bruneton, 1999**). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Dacosta, 2003**).

I.7.L'effet thérapeutique

Sur le plan thérapeutique, Il y a beaucoup de recherches qui ont prouvé les bénéfices pour la santé et les effets protecteurs de la courge et de ses parties comme les graines , la pulpe et leurs extraits (composants bioactifs).

I.7.1.Effets hypolipémiant

Makni et ses collègues évalués par le modèle animal base étude expérimentale (rats), rôle de la graine de courge et de la graine de lin mélange en fournissant un régime de cholestérol 1%. Après avoir terminé l'étude, ils ont observé l'augmentation considérable des monoinsaturés niveaux d'acides gras (MUFA) et polyinsaturés (PUFA) dans les graines nourries groupe. L'activité anti-athérogène des graines de courge et flex mélange a été indiqué par le niveau de défense antioxydante renforcée système et taux de malondialdéhyde (**Makni et al.**) Certains chercheurs ont étudié le rôle de la supplémentation en huile de les graines de citrouille sur le cholestérol total et les lipoprotéines de basse densité,cholestérol et lipoprotéines de haute densité cholestérol, systolique et TA diastolique (tension artérielle) chez les rats non ovariectomisés et des rats ovariectomisés qui ont été nourris avec de l'huile de citrouille graines et huile de cors 5 jours par semaine pour une durée totale de 12 semaines (supplémentation de 40 mg/kg par voie orale). L'évaluation de des échantillons de sang ont

confirmé des niveaux élevés de lipides sains dans le groupe nourri avec supplément d'huile de pépins de courge (**Gossell-Williams et Al.**) Les deux enquêteurs ont testé les effets des graines de citrouille. chez le rat riche en cholestérol nourri par des graines de citrouille en combinaison avec les graines flexibles ou les graines de pourpier. L'administration des 2% régime anti-cholestérol provoque une augmentation du cholestérol total, des triglycérides et lipides totaux dans le foie et le sérum. L'utilisation de la citrouille mélange de graines et de graines de lin ou de graines de citrouille et de graines de pourpier provoquent une réduction des lipides et sont suggérés comme ces combinaisons de graines ont une activité anti-athérogène (**Barakat et al.**).

I.7.2.Effets antimicrobiens

La principale cause de décès de nombreuses personnes est la bactérie, parasites, virus et champignons qui développent de nombreuses maladies et entraînent à mort en dépit de l'environnement hygiénique et des aliments. La l'huile des grains de courge contient des composants antimicrobiens composants et ont été isolés de ce dernier ,à la concentration de 2% inhibe la croissance de *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Typhimurium* et *Staphylococcus* (**Hammer et al.**).

La protéine de base des graines de citrouille MAP2, MAP11 et MAP4 avait été exploré pour arrêter la croissance de la cellule de levure. Parmi tous les basiques protéines, le MAP11 a montré plus d'effets inhibiteurs que autres protéines. MAP2 et MAP4 n'ont pas inhibé la croissance de la bactérie G^{-ve} (gram négatif) *Escherichia coli*(**Cheong et al.**). De plus, il a été signalé que, à partir des graines de citrouille, exsudats de phloème ayant des propriétés antifongiques et inhibant la champignon pathogène(Xie). Park et ses collègues ont isolé le nouveau protéine connue sous le nom de protéine pr-1 sous forme de graines de citrouille qui ont des propriétés antifongiques potentiel sans toxicité dans les érythrocytes humains (RBC). Ce est la protéine stable à la chaleur et stable à une température de 700C sans activité inhibitrice de croissance contre *E. Coli* et *Staphylococcus* bactéries(**Park et al.**).

I.7.3.Effets hypertenseurs et protecteurs du cœur

Les graines de citrouille ont un rôle essentiel dans la tension artérielle abaissement et relâchement des vaisseaux sanguins. Il a été examiné le rôle et effets de l'huile de pépins de courge chez les rats hypertendus pression induite par des produits chimiques. L'huile servie quotidiennement pendant 6 semaines, l'huile varie entre 40 et 100 mg par kg. Consommation de l'huile a sensiblement diminué la pression artérielle élevée résultant de l'induction par des

modifications chimiques et électro cardiographiques est également devenu normal. Il maintient également le niveau réduit de NO métabolites à la plage normale et augmentation du niveau de MDA pour diminuer. Le résultat global a confirmé l'effet protecteur de la citrouille l'huile de graines vers les modifications pathologiques de l'aorte et des coronaries cœur. La production de NO est indiquée par l'acide aminé L-arginine.

De plus, la teneur élevée en magnésium (mg) des graines de citrouille l'huile est reconnue pour réduire les risques de crise cardiaque. les graines de citrouille comme complément alimentaire ont exposé les mêmes effets à l'inhibiteur calcique comme médicament amlodipine **(El-Mosallamy et coll)**

I.7.4.Effets anti-carcinogènes

Le cancer est le problème de santé le plus répandu. Le plus grand défi pour les enquêteurs, les professionnels et les chercheurs est de sélectionner des stratégies préventives et thérapeutiques pour prévenir et guérir le cancer. De nombreux fruits et légumes ont été découverts pour minimiser le facteur de risque du cancer. Les régimes contenant une grande quantité de graines de citrouille ont été identifiés comme réduisant les risques de cancer. On a constaté que l'huile de graines de citrouille réduit les risques de cancer car elle contient une quantité élevée de pigments caroténoïdes **(Jian et al)**. **GossellWilliam et ses collègues** ont déterminé le rôle de l'huile de pépins de courge dans l'hyperplasie chimique (testostérone) induite par les rats. Les rats ont été nourris avec de l'huile de pépins de courge et de l'huile de maïs pendant l'induction de l'hyperplasie pour une durée de vingt jours. Au 21ème jour, la prostate a été pesée puis tuée et analysée. On a constaté que l'inhibition de la croissance de la prostate était plus importante chez les rats qui avaient été nourris avec de l'huile de pépins de courge (2mg par 100g). Les effets protecteurs de l'huile de pépins de courge étaient plus considérables à haute dose. Le résultat de l'étude de recherche développe l'espoir pour le cancer management **(Gossell William et al)** . **Hong et collègues** ont été conduits un double aveugle placebo-contrôle randomisé sur les patients hyperplasia. La tâche du cancer a diminué et a également amélioré la qualité de vie globale des personnes **(Hong et al)**. Un questionnaire sur la fréquence des aliments a été élaboré et un groupe de femmes vulnérables au cancer a été nourri de graines de citrouille et de graines de tournesol. A la fin de la période de consommation et d'étude, il a été conclu que les graines de citrouille et de tournesol sont associées à des risques significativement post-ménopausiques de cancer du sein **(Zaineddin et al.)**

I.7.5.Effets antidiabétiques

De nombreuses recherches ont montré que les graines de citrouille et le potiron contiennent les composants qui abaissent le taux de glucose dans le sang. De nombreuses personnes diabétiques évitent la consommation de citrouille en raison de sa teneur élevée en glucides alors qu'il n'y a aucune menace de la consommation de citrouille. Il a été déterminé que les effets hypoglycémiques et antioxydants des graines de citrouille et des graines de lin combinées chez des rats diabétiques. Les caractéristiques d'altérations histopathologiques ont CAT(Chloramphénicol acétyltransférase), GSH(Growth stimulating hormone) et SOD (superoxyde dismutase) et une diminution de MDA (malondialdéhyde et enzyme antioxydante). Les augmentations du glucose, des lipides globaux triglycérides et du cholestérol global dans le plasma étaient sensiblement (**Makni et al**) n'ont pas réagi. Il a été déterminé que l'huile de de graines de courge diminue le niveau élevé des d'enzymes alanine aminotransférase (ALT) dans le plasma et aspartate aminotransférase qui inversent les risques d'apparition du diabète. Il est consommé dans le cadre d'une alimentation normale peut être utile pour la prévention du diabète et les complications du diabète(**Makni et al**). On a déterminé les effets hypoglycémiques de la protéine isolées de différents types de graines de citrouille de la famille des Cucurbitaceae, notamment famille des Cucurbitaceae. Le résultat de la prise de tolérance au glucose par voie orale réalisée sur des rats a permis de découvrir que la globuline devenait la protéine de stockage la plus ample qui a calculé 295 milligrammes par gramme de matière sèche calculée et capable de provoquer une baisse significative du taux de sucre dans le sang (88 % à 137,80 %).à 137,80%) (**Teugwa et al**)

Partie 02 :
Hydrolyse
enzymatique des
grains de courge

I.1.Généralité

Depuis une vingtaine d'années, de par leurs multiples fonctions ou activités, les peptides intéressent particulièrement les industriels des secteurs de l'alimentaire, de la cosmétique ou de la pharmacie. En effet, dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés pour leurs propriétés nutritionnelles (**Clemente, 2000**), sensorielles (**Gill et al., 1996**) mais également fonctionnelles (**Panyam et Klara, 1996**) Les secteurs de la cosmétique et de la pharmacie s'intéressent également aux peptides pour leurs activités biologiques ou physiologiques. De nombreuses études ont en effet montré que les peptides, en particulier les petits peptides (< 1000 g/mol), peuvent être biologiquement actifs (peptides antibiotiques, antiviraux, anti-hypertensifs, morphino-mimétiques et autres), ou encore peuvent posséder des activités anti-oxydantes ou être hypoallergéniques (**Pihlanto-Leppälä, 2001 ; Gill et al., 1996**). Suivant les applications finales, il existe plusieurs méthodes pour la production d'un peptide ou d'un mélange de peptides. Ces derniers peuvent être :soit synthétisés à partir d'acides aminés , soit générés par hydrolyse enzymatique ou chimique de protéines alimentaires.

Les peptides synthétiques sont largement utilisés dans la recherche fondamentale et dans les secteurs de la pharmacologie afin de cribler des peptides bioactifs à haute valeur ajoutée. Les peptides synthétiques sont encore très peu utilisés dans l'alimentaire. La synthèse de peptides peut être réalisée soit par voie chimique, soit par voie enzymatique, soit par génie génétique. Le choix de la méthode dépend principalement de la longueur du peptide et de la quantité à produire (**Gill et al., 1996**).

Enfin, les peptides peuvent être synthétisés par l'action catalytique des protéases en milieu non-aqueux. Bien que cette méthode présente un certain nombre d'avantages par rapport à la méthode chimique classique (assez peu coûteuse, non dangereuse, pas de racémisation des acides aminés), la disponibilité restreinte des protéases, le manque de connaissances sur la spécificité des protéases dans les milieux non-aqueux et la faible productivité restent les principaux obstacles pour une large utilisation de cette méthode (**Gill et al., 1996**).

I.2.L'Hydrolyse

L'hydrolyse est une approche alternative pour valoriser un produit pour obtenir d'autre produit présente de nouvelles propriété fonctionnelle et biologique (**Erdman et al ,2008-**), L'hydrolyse d'une substance est sa décomposition par l'eau, grâce aux ions H^+ et OH^- Provenant de la dissociation de l'eau. Pour des substances organiques telles que les protéines, une hydrolyse équivaut à la coupure des liaisons peptidiques entre les différents acides aminés en molécules de plus petite taille ; polypeptides ; peptides et acide amine libre le produit obtenu et nommé Hydrolysats Protéique (**Ifremer ; 2012**).

Les protéines à l'origine des hydrolysats proviennent de sources variées, d'origine animal ou laitière, plus récemment, l'étude des protéines végétales comme substrat d'hydrolyse a connu un essor important. Les protéagineux, comme le colza ou le tournesol (**Alashi et al., 2013 ; Nioi, 2013**), et les légumineuses, comme les pois, les grains, le soja ou la cacahuète (**de Castro et Sato, 2014 López-Barrios et al., 2014 ; White et al., 2014**) sont les principales sources végétales étudiées.

Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée (73% à 85%) obtenus par différentes méthodes telles que ; utilisation des solvants (Acide ou basique), ou d'enzyme par autolyse (uniquement sous l'action d'enzyme endogène,) ou hétérolyse (addition d'enzyme exogène). (**Dumay, 2006 ; Nguyen, 2009**) (**Roy et Durand ;1997**) donc les hydrolysats obtenus par voie chimique ou enzymatique.

I.2.1.Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique des protéines résulte du clivage des liaisons peptidiques par l'action d'un acide ou d'une base (HCl , $NaOH$) sous des conditions intenses de pH, pression et de température à $100^\circ C$ (**Kristinsson & Rasco, 2000**) Bien qu'elle soit simple, peu dispendieuse cette dernière présente tellement de désavantages qu'elle n'est quasiment pas utilisée dans le cadre d'applications alimentaires ou pharmacologiques. En effet, les modifications chimiques sont drastiques et peu spécifiques, ce qui entraîne la perte de certains acides aminés, la production de molécules toxiques.

D'une part, l'hydrolyse acide des protéines conduit à la destruction totale du tryptophane, à la destruction partielle de la méthionine et à la transformation de la glutamine

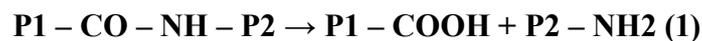
et de l'asparagine en leurs acides correspondants (**Jennings et Lewis, 1969**). D'autre part, l'hydrolyse alcaline provoque la racémisation des acides aminés et la destruction par β -élimination de certains acides aminés comme la cystéine, la sérine et la thréonine. Il en résulte alors des composés potentiellement toxiques (**Linder et al., 1995**). Enfin, le plus dommageable concernant les procédés d'hydrolyse chimique provient de la difficulté à reproduire les peptides cibles car ne présente aucune sélectivité de coupure et difficile à contrôler (**Clemente, 2000**).

Également, l'hydrolyse chimique produit des hydrolysats contenant des peptides et des acides aminés ayant une valeur nutritionnel réduite et de faible propriété fonctionnelle et thérapeutique (**Clemente, 2000 ; Kristinsson & Rasco, 2000**).

I.2.2.Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique de protéines végétale ne présente pas les désavantages de l'hydrolyse chimique. Ainsi, la composition en acides aminés des hydrolysats protéiques est similaire à celle de la protéine d'origine : (**Maldonado et al., 1998**).

Le procédé le plus utilisé pour la production d'hydrolysats protéiques est l'hydrolyse enzymatique, réalisée par l'action d'enzymes particulières, L'hydrolyse enzymatique des protéines végétales est catalysée par des protéases, qui clivent les liaisons peptidiques entre deux acides aminés en consommant une molécule d'eau par liaison clivée (**Eq. 1**).



D'où le clivage continu des liaisons peptidiques décompose les protéines en produits de faible poids moléculaire tels que les peptones, les peptides et les acides aminés (**Adler-Nissen, 1986**).

Dans l'hydrolyse enzymatique le taux de clivage des liaisons peptidique dépend principalement de deux facteurs la spécificité de l'enzyme et l'accessibilité aux liaisons peptidique (**Adler-Nissen, 1986**) en effet, la spécificité de l'enzyme est un facteur très important qui détermine les sites de coupure de la protéine et donc la nature des peptides

résultant de l'hydrolyse (**Alashi et al., 2013**) (**Clemente, 2000** ; **Tavano, 2013**) . La qualité des hydrolysats obtenus dépend de leur composition en acides aminés et de leur distribution de masses molaires (**Johns et al., 2011** ; **Neklyudov et al., 2000**). Le premier critère est directement lié au profil en acides aminés et notamment au ratio d'acides aminés essentiels présents dans la protéine initiale. La distribution de masses molaires, elle, peut être contrôlée par le choix de l'enzyme, les conditions opératoires et le degré d'hydrolyse final (**de Castro et Sato, 2014** ; **He et al., 2013**).

I.3.Les enzymes protéolytiques

Les protéases sont des catalyseurs biologiques présentant, d'un côté, une spécificité réactionnelle liée à la conformation et à la composition en acides aminés de leurs sites catalytiques et présentant, d'un autre côté, une spécificité au niveau du substrat liée à la complémentarité tridimensionnelle entre l'enzyme et le substrat (**Godon, 1996**) Le commerce fournit aujourd'hui un très large choix de protéases aux spécificités diverses et aux valeurs optimales de pH et de température différentes (**Panyam et Kilara, 1996**) .Leurs origines sont aussi très diverses puisqu'elles peuvent être d'origine végétale (papaïne, bromélaïne, kératinase...), animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine, rénine...), bactérienne (Protamex, Alcalase, Neutrase...), fongique (Corolase, Flavourzyme...)

Les enzymes protéolytiques sont classées en tant qu'endoprotéases ou 'exoprotéases : Les endoprotéases hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la protéine d'où production de peptides plus ou moins longs tandis que les exoprotéases clivent les liaisons peptidiques situées aux extrémités N- ou C-terminales entraînant la libération d'acides aminés, de dipeptides ou de tripeptides (**Clemente, 2000**) La capacité des protéases à hydrolyser un substrat protéique est très variable ; la spécificité de l'enzyme dicte le nombre et la localisation des liaisons peptidiques clivables (**Panyam et Kilara, 1996**). Les protéases peu ou non spécifiques clivent plusieurs liaisons peptidiques tandis que les protéases à spécificité étroite ne clivent qu'après ou avant des acides aminés précis.

Tableau06 : spécificité de quelques protéases (**Rao et al., 1998**)

Enzyme	Pont peptidique clivé
Trypsine	- Lys (ou Arg) \perp ----
Chymotrypsine, subtilisine	- Trp (ou Tyr, Phe, Leu) \perp ----
Protéase V8 de <i>Staphylococcus</i>	- Asp (ou Glu) \perp ----
Papaïne	- Phe (ou Val, Leu) -Xaa \perp ----
Thermolysine	- -- \perp Leu (ou Phe) ----
Pepsine	- Phe (ou Tyr, Leu) \perp Trp (ou Phe, Tyr) -

(\perp : site d'action de la protéase ; Xaa : n'importe quel acide aminé.)

Les endoprotéases sont sous-classées en quatre groupes suivant leur mécanisme catalytique : les sérine protéases, les aspartyl protéases, les cystéine protéases et les métalloprotéases (**Rao et al., 1998**).

➤ La Trypsine

La trypsine ou sérines protéases (EC 3.4.21.4) est une endoprotéase sécrétées par la cellule acineuse du pancréas sous forme de trypsinogène inactif (**SZmola et al 2003 Wu et al 2004**)le pancréas humaine délivre quotidiennement 6 à 20g d'enzyme (de proenzyme inactive ou zymogène) (**Medart 2005**).

La trypsine joue un rôle clé dans le duodénum car elle susceptible d'activer par coupure protéolytique l'ensemble des zymogènes présent dans le sac pancréatique ou une enzyme exprimé a la membrane de l'entérocyte duodénale appelé enter peptidase et dont la Seule fonction comme est d'activer la trypsinogène pancréatique en trypsine ; cette enzyme hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidique du trypsinogène LYS 15 - ile16 excitant ainsi son hexapeptide N-terminale pour donner l'enzyme active (**Voet et Voet 1998 Bernadrd et al 2006 tryphine**) .

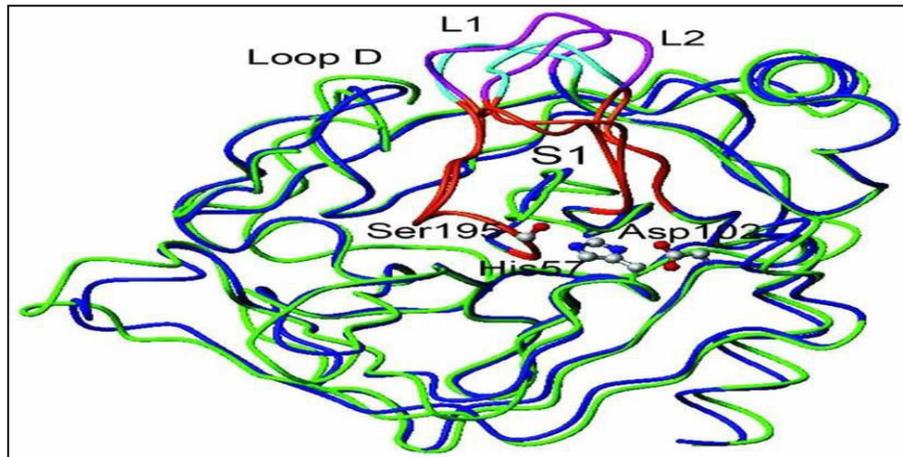


Figure 02 : structure tridimensionnelle de la trypsine (D'après Gerlet et Gasmani 1993)

Les sérines protéases sont caractérisées par la présence d'une sérine dans leur site actif. Suivant leur structure primaire, La trypsine possèdent un mécanisme catalytique nécessite une triade d'acide aminé pour former leur site actif , une serine agit comme premier nucléophile aidée par des interactions spécifiques avec la chaîne latérale d'un groupement histidine lui-même interagissant avec un résidu d'acide aspartique après la formation du complexe enzyme -substrat ES le groupement carbonyle du lien scissile P1 est attaqué par la Triade formant un intermédiaire oxyanionique

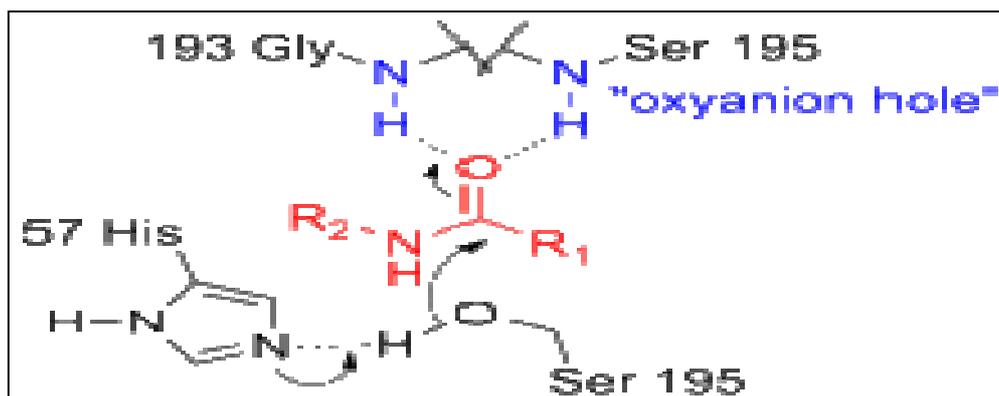


Figure 03 : triade de cite catalytique de la trypsine (d'après E.jaspard 2011)

La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés basiques, (Lys et Arg) l'activité optimale de cette endoprotéase est à un PH optimale se situe

entre 6 et 8. et une température optimale entre (37 – 40 C°) (Bhagwwandin et al 2003 (SZmola et al 2003)

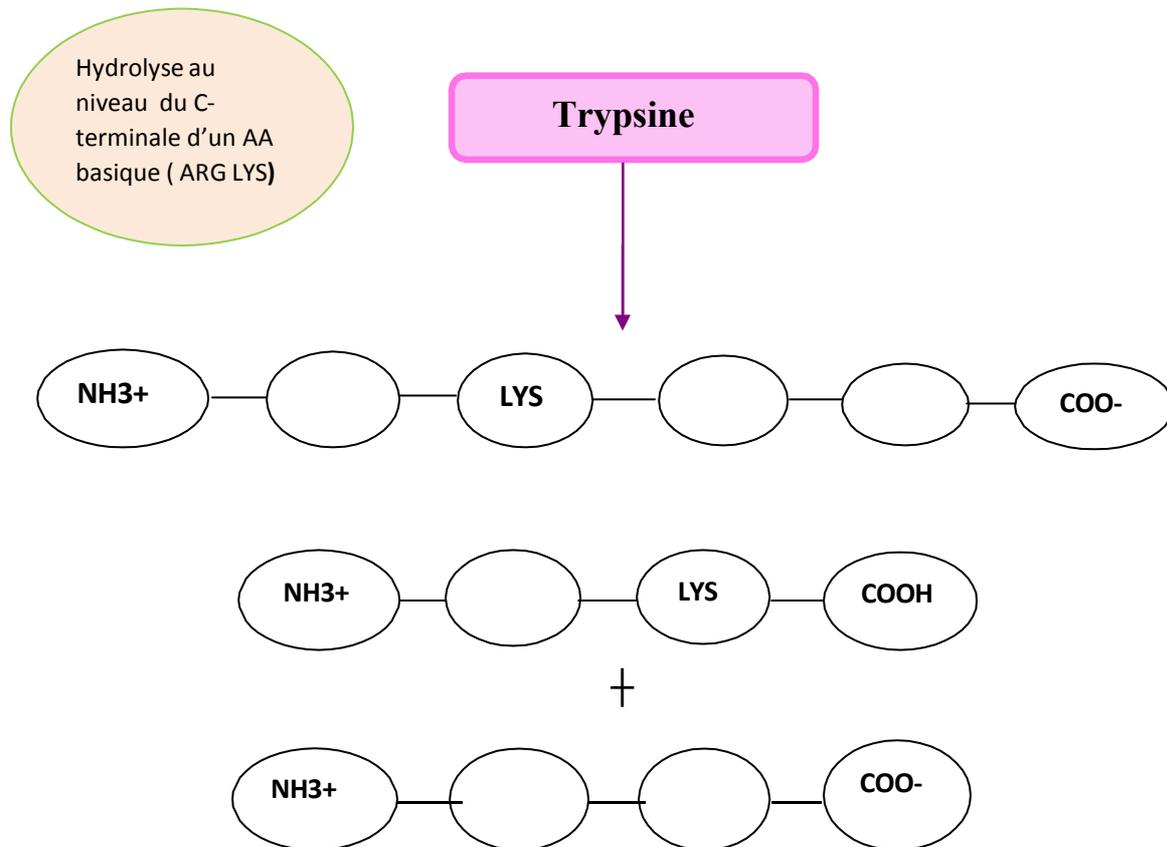
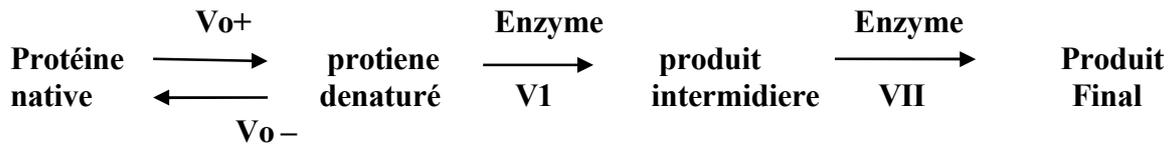


Figure 04 : sites de clivage trypsique des liaisons peptidiques lors de l'hydrolyse Enzymatique

I.4.Mécanismes et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique

La dégradation enzymatique des protéines aboutit à la production d'hydrolysats protéiques valorisables dans de nombreux domaines tels que la pharmacie, l'alimentation humaine et la cosmétique. Les mécanismes impliquent souvent une réaction catalytique de type interaction enzyme-substrat se résumant au modèle de **Linderström-Lang** repris par **Adler-Nissen (1976, 1986)** dans lequel l'hydrolyse initiale de substrat peut conduire à deux types de réactions en fonction de la vitesse de dénaturation des protéines :



(où $V_0 = V_{+0} + V_{-0}$)

Cette réaction est du type « one by one » selon la terminologie de Linderström-Lang. Le mécanisme des réactions enzymatiques a intéressé de nombreux auteurs sur divers substrats, notamment les protéines végétales (**Adler-Nissen et al., 1982 ; Moreno et Cuadrado, 1993 ; Nouri et al., 1997**), **Mohr (1980)** a émis l'hypothèse que dans le cas d'une hydrolyse d'un substrat insoluble, les réactions se déroulent en deux étapes : l'enzyme s'associe à la liaison peptidique du substrat préalablement à la réaction d'hydrolyse qui libère un mélange de peptides solubles et d'acides aminés.

La cinétique généralement constatée est une hydrolyse rapide après ajout de l'enzyme, la vitesse de la réaction diminue après avoir atteint une vitesse maximale. Ainsi **Moreno et Cuadrado (1993)**, étudiant l'hydrolyse des protéines de pois, ont suggéré que l'allure de la courbe d'hydrolyse peut être attribuée aux phénomènes suivants :

- décroissance de la concentration en liaisons peptidiques disponibles due à une vitesse initiale de dégradation élevée
- décroissance de l'activité de l'enzyme due à la température
- inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction

I.5. Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique

La réaction enzymatique est influencée par des paramètres qui permettent de contrôler la vitesse et le degré d'hydrolyse (DH). Pour un système enzyme/substrat donné, les conditions réactionnelles de l'hydrolyse affectent considérablement les caractéristiques moléculaires des peptides (**Godon, 1996**). Les paramètres d'hydrolyse les plus importants sont la température, les concentrations initiales en enzyme et en substrat, la durée, le pH et l'étendue de l'hydrolyse (**Lahl et Braun, 1994**).

❖ Le rapport enzyme / substrat et la concentration du substrat

Les valeurs de la concentration initiale en protéines (S_0) utilisées dans les procédés d'hydrolyse sont très variables d'une publication à l'autre. La concentration initiale en enzyme (E_0) est aussi un paramètre important puisque plus elle est élevée, plus la réaction d'hydrolyse est rapide. Dans un système où l'enzyme est saturée par le substrat, la vitesse réactionnelle est généralement proportionnelle à la concentration initiale en enzyme il a déjà été montré que, pour de très faibles ratios E_0/S_0 , le mécanisme d'hydrolyse semble différer de celui obtenu pour d'autres ratios E_0/S_0 ; en effet, l'enzyme semble présenter une spécificité plus étroite (**González-Tello et al., 1994a ; Adler-Nissen, 1987**) . ; (**Nouri et al.1997**) ont observé une augmentation de la vitesse de dégradation de la Protéine native (S) de blé proportionnellement à une augmentation de la concentration de l'enzyme.

❖ Le pH

Les conditions les plus critiques pour maximiser l'activité d'une enzyme sont le pH et la température réactionnelle qui sont, la plupart du temps, ajustés aux valeurs optimales connues des enzymes. Le pH modifie, d'une part, l'état d'ionisation des groupements du site actif de l'enzyme impliqués dans la réaction et dans la reconnaissance du substrat, et modifie, d'autre part, la distribution de charge et la solubilité du substrat. Ainsi le pH peut, en modifiant le mécanisme réactionnel, l'affinité enzyme-substrat et l'accessibilité des liaisons peptidiques du substrat par l'enzyme, modifier significativement la catalyse enzymatique. Selon le pH de la réaction, les liaisons peptidiques du substrat sont clivées plus ou moins rapidement **Langmyhr (1981)**, montre que les molécules d'enzymes se fixent sur les liaisons peptidiques selon un processus rapide dans les conditions optimales de PH **Adler Nissen (1982)**) a montré que la variation de pH provoque un changement de la conformation aussi bien au niveau du substrat que de l'enzyme.

❖ la température

Lorsque l'influence de la température est observée sur l'activité protéolytique, les résultats présentent le plus souvent une courbe typique en « cloche » ou en « plateau ».

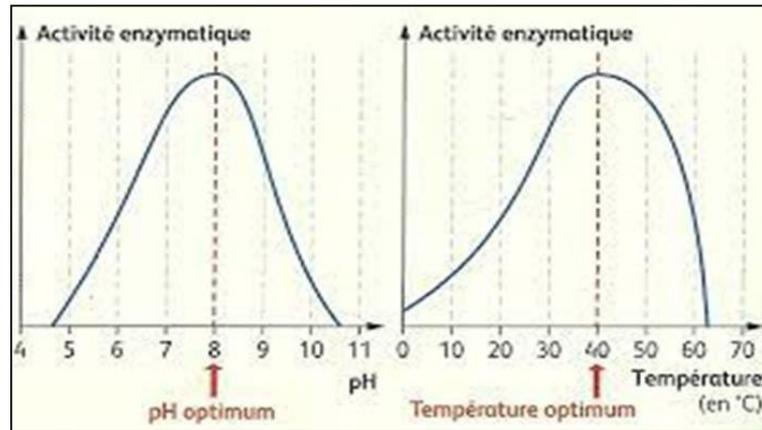


Figure 05: Variation de la vitesse de réactions enzymatique en fonction du PH et T°
(Godon, 1996)

D'une part, comme pour toute réaction chimique, l'augmentation de la température active la cinétique de la réaction. D'autre part, les enzymes, qui sont des molécules protéiques, sont thermosensibles et donc irréversiblement dénaturées aux températures élevées. La compétition entre ces deux contributions opposées de la température a introduit la notion de température optimale de la réaction. Les protéases, dans leur grande majorité, catalysent des réactions pour des températures comprises entre 20 °C et 75 °C mais leur température optimale varie en fonction du pH et du ratio enzyme/substrat (**Constantinides et Adu-Amankwa, 1980**).

❖ Degré d'Hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) se définit comme le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées par rapport au nombre de liaisons peptidiques initialement présentes dans la protéine. Le degré d'hydrolyse des liaisons peptidiques peut être mesuré par différentes techniques. La méthode la plus utilisée, la plus simple et la plus rapide est la méthode du pH-stat, basée sur le contrôle du pH réactionnel par titrimétrie suivant l'ajout d'une base dans le milieu réactionnel.

Cette méthode s'applique uniquement aux réactions effectuées à pH neutre-alkalin. Dans ces conditions, l'hydrolyse de liens peptidiques mène à la libération de groupements carboxyliques ionisés (COO^-) qui abaissent le pH du milieu réactionnel. Ainsi, la quantité de base ajoutée pour maintenir constant le pH réactionnel est directement proportionnelle au

nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (**Jacobsen et al., 2006**). Avec cette technique, la valeur h est calculée à partir de l'équation suivante :

$\text{DH (\%)} = \frac{\mathbf{B} \times \mathbf{N}_b}{\alpha \times \mathbf{MP} \times \mathbf{htot}} \times 100$	<p>B : consommation de base (mL)</p> <p>N_b : normalité de la base (N)</p> <p>α : degré moyen de dissociation de groupement α-aminés</p> <p>htot : nombre total de liaisons peptidiques du substrat protéique en (méq v/g protéines)</p> <p>M_p : masse de protéine (N × facteur de Kjeldahl) (g)</p>
---	--

Les avantages de la technique pH-Stat sont sa simplicité et le maintien de l'enzyme à son pH optimal au cours de la réaction, ce qui favorise une vitesse d'hydrolyse élevée. La méthode du pH-stat n'est généralement pas préconisée pour des valeurs de pH extrêmes (>11 et < 3) à cause du pouvoir tampon élevé des solutions protéiques (**Adler-Nissen, 1986**).

I.6. Les peptides bioactifs

Les protéines alimentaires constituent une source importante d'énergie (4 kcal/g de protéines) et d'acides aminés essentiels, qui sont nécessaires à la croissance et le maintien des fonctions physiologiques telles que la réparation des tissus et la signalisation cellulaire. Des recherches récentes ont montré que des peptides provenant de différentes sources telles que les produits laitiers, les plantes, les animaux et les fruits de mer présentent un large éventail de bioactivités, par exemple des activités antimicrobiennes (**Tang et al., 2015**), immunomodulatrices (**Mechkarska et al., 2014**), antihypertensives (**Capriotti et al., 2015**) et antioxydantes (**Babini et al., 2017**) le plus grand nombre de peptides bioactifs isolés à ce jour est des protéines du lait. Les autres sources comprennent la viande, le poisson, les œufs, les sources végétales telles que le soja et le blé et les grains (**Hartmann et Meisel, 2007**).

Les protéines de légumineuses comme les grains de courges peuvent constituer une source potentielle de peptides biologiquement actifs . Ces peptides bioactifs sont des séquences d'acides aminés (2-50 acides aminés) encryptées dans la molécule protéique et demeurent inactives jusqu'à ce qu'elles soient libérées par digestion gastro-intestinale ou par hydrolyse enzymatique in vitro les peptides de faible poids moléculaire, surtout les di- et tripeptides, sont généralement plus facilement absorbés par l'organisme et sont plus efficaces que les peptides de plus haut poids moléculaire ainsi que les acides aminés libres (**Matthews,**

1983; Wu, Aluko, & Muir, 2008) le caractère bioactif d'un peptide réside dans sa capacité à améliorer la santé humaine, grâce à leurs effets antimicrobiens, antioxydants, anti-thrombotiques, anti-hypertensifs, anti-cancéreux, immunomodulateurs et opioïdes (Alashi et al., 2013 ; Chalamaiah, Kumar, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012 ; Hernandez-Ledesma et al., 2011), l'activité biologique peut varier d'un peptide à un autre, de nombreux essais ont été réalisés pour l'isolement, la purification et l'identification des fractions peptidique avec l'activité biologique désirée. Ces procédés peuvent séparer les biopeptides dans les hydrolysats protéiques des grains de courge en fractions selon leurs propriétés physicochimiques, tels que leur taille, leur charge ou leur caractère hydrophobe.

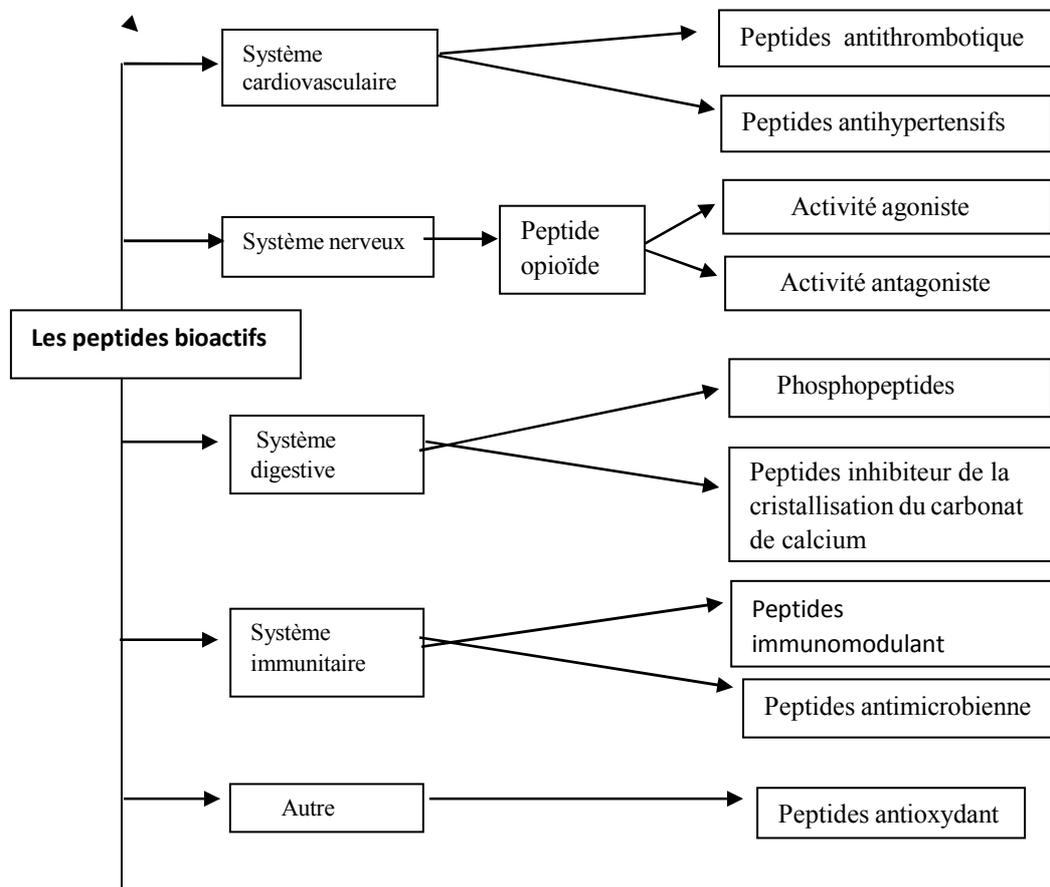


Figure 06 : fonctions des peptides bioactifs (inspiré de Silva et Malcata, 2004).

➤ **les Peptides antioxydants**

Selon la littérature, l'hydrolyse de protéines alimentaires à l'aide d'enzymes génère certains peptides possédant des propriétés antioxydantes (**Samaranayaka & LiChan, 2011**). Ces antioxydants peuvent agir à titre de capteurs de radicaux libre même d'agents chélateurs d'ions métalliques (**Ghribi et al., 2015**). Cela a notamment été démontré sur des protéines contenues dans les oléagineux tels les graines de lin (**Marambe et al., 2008**), le canola (**Cumby et al., 2008; Zhang et al., 2008**) et le soya (**Chen et al., 1995**),

Cependant, il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les séquences des peptides antioxydants des grains de courge. Pour cette raison, les principales caractéristiques des peptides antioxydants seront basées sur celles des peptides d'autres sources reportées dans la littérature..

➤ **Les peptides antimicrobiens PAMS**

A ce jour, plusieurs centaines de peptides antimicrobiens différents ont été isolés. Bien qu'ils diffèrent par leur taille et leur séquence, ces peptides possèdent deux caractéristiques communes ; ils sont polycationiques et leur structure active est amphiphile. Ces peptides sont divisés en deux classes : les peptides cycliques et les peptides linéaires (**Tossi et al., 1997**).

Ces peptides agissent soit en créant des perturbations au niveau des échanges membranaires du microorganisme suite à la formation de ponts ioniques et à la perméabilisation de la membrane, soit en atteignant une cible spécifique intracellulaire qui active l'autolyse de la bactérie (**Epand et Vogel, 1999 ; Biziulevičius et al., 2002**). Les peptides antimicrobiens naturels peuvent provenir de diverses origines. Par exemple, les défensines sont d'origine végétale également appelées γ -thionines, c'est l'une des premières classes de PAM découverts. D'un poids moléculaire d'environ 5 kDa, elles comportent entre 45 et 54AA et contiennent 4, 6 ou 8 résidus cystéine. (**Stotz et al. 2009**)

Partie 03 :
Les activités
biologiques des grains
de courge

I.1.Activité antioxydant

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. dû à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

Les graines de courge possèdent une activité antioxydante. À ce sujet, le stress oxydatif et les antioxydants seront définis. De même, la classification des antioxydants et leurs méthodes de mesures in-vitro seront abordées dans cette section.

I.1.1.Stress oxydatif

Depuis plusieurs décennies, le monde scientifique est envahi par un concept biologique majeur, celui du « stress oxydatif ». Il a été défini en 1985 par Sies comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression de composés pro oxydants. Cette situation aboutit à un déséquilibre de notre balance oxydative. Le stress oxydatif se définit comme un manque d'équilibre au niveau des espèces réactives oxygénées et la capacité de l'organisme à contrer cette action par différents systèmes de protection dont les antioxydants (**Pisoschi & Pop, 2015**). le stress oxydatif est donc une agression de l'organisme par des espèces chimiques oxygénées (**He et al., 2013**)

Ces espèces radicalaires sont générées de façon permanente au sein de l'organisme, et est principalement liée au métabolisme cellulaire.(La respiration mitochondriale ; La phagocytose) (**Baldrige**) et (**Haleng**) Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un ou plusieurs électron non apparié sur leur dernière orbitale. (**Pisoschi & Pop, 2015**). Cette propriété rend ces éléments très réactif du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. (**Dacosta, 2003**).

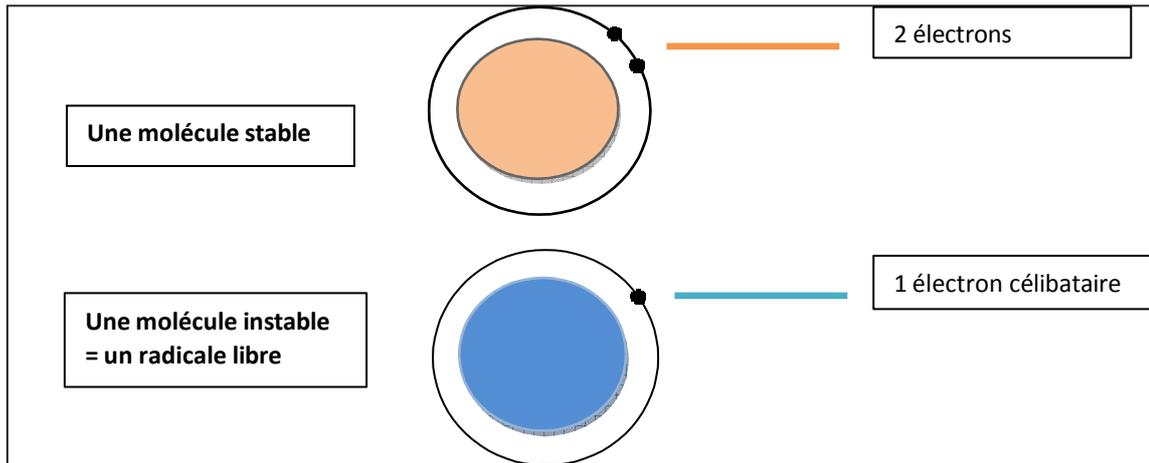


Figure 07 : Représentation d'un radical libre (**Dacosta 2003**)

I.1.2. Antioxydants

Afin de contrer l'action oxydante des radicaux libres, l'organisme dispose de plusieurs mécanismes protecteurs qui vont permettre la détoxification des radicaux libres. Néanmoins, il est important de noter que l'organisme ne cherche pas à les éliminer totalement, mais à contrôler leur niveau. Les antioxydants permettent de diminuer le risque de survenue de nombreuses pathologies.

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres. Trois mécanismes d'action pour les antioxydants existent. Ils peuvent agir en arrêtant les réactions de propagation des radicaux libres par l'échange d'au moins un proton avec un radical libre. Ils peuvent diminuer et/ou bloquer la formation de radicaux libres par la complexation de métaux grâce à leur pouvoir chélateur d'ions métalliques. Enfin, ils peuvent diminuer la concentration d'espèces réactives oxygénées (**Bazinet & Doyen, 2015; Yehye et al., 2015**).

Les antioxydants peuvent capter les radicaux libres selon différents facteurs tels que leur réactivité chimique, leur concentration et leur mobilité dans l'environnement (**de Castro & Sato, 2015**). Les antioxydants peuvent être classés selon leurs origines en deux classes : les antioxydants primaires (enzymatiques) et les antioxydants secondaires (non enzymatiques) localisés dans les compartiments intra et extracellulaires (**Cano et al., 2006**).

❖ Antioxydants primaires enzymatique

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydants qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase (CAT) et de glutathion peroxydase (GPx) (Favier, 2006). Le rôle majeur du SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Le glutathion peroxydase (GPx) neutralise le peroxyde d'hydrogène en présence du glutathion. (Lubrano et Balzan, 2015).

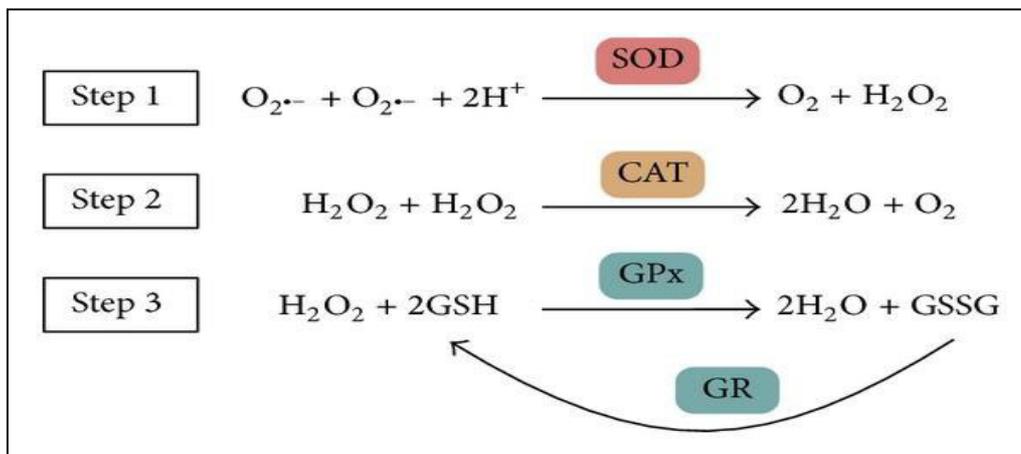


Figure 08 : Réactions clés des défenses enzymatiques antioxydantes (favier, 2003)

❖ Antioxydants secondaires non enzymatique

Les antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, capable de réagir, in vitro, (Pisoschi et Pop, 2015). Les antioxydants exogènes comprennent, principalement, Les antioxydants d'origine alimentaire Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. (Berger., 2005). Cette classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules (Pastre,2005).

❖ Les antioxydants alimentaire

Le bêta-carotène est le chef de file du groupe des caroténoïdes. C'est un piègeur non stœchiométrique d'oxygène singulet et très avantageux, puisqu'une seule molécule de bêta-carotène est capable d'inactiver des centaines de molécules d'oxygène singulet et Il est à noter que cet effet antioxydant ne survient qu'à des doses physiologiques ou alimentaires.

Le bêta-carotène peut devenir délétère à doses pharmacologiques, notamment chez les fumeurs, puisque le stress oxydant lié au tabagisme peut altérer le métabolisme du bêta-carotène, libérant alors des métabolites procarcinogènes.

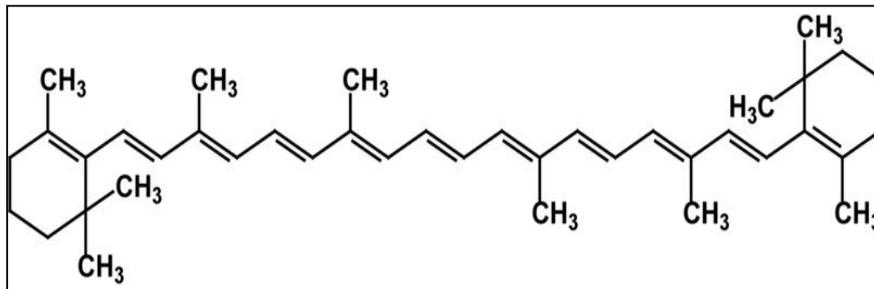


Figure 9 : structure chimique de bêta-carotènes d'après (Rahman ,2007).

Concernant les polyphénols sont les antioxydants les plus répandus dans notre alimentation et en particulier, les flavonoïdes, de nombreux travaux leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives issues de l'oxygène et impliqués dans l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques (ADN, ARN). Cette action, largement étudiée, est citée comme une clé pour la prévention des maladies chroniques directement liées avec le stress oxydatif tels que les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies neuro-dégénératives et le vieillissement (Nibir et al., 2017).

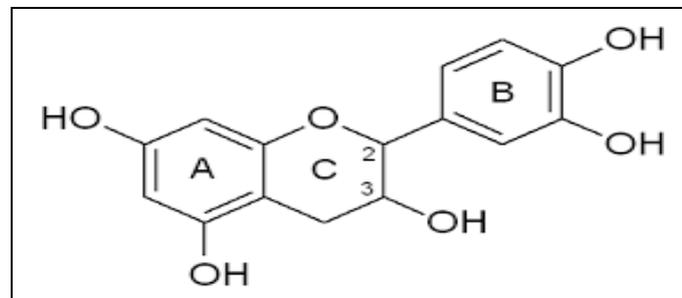


Figure 10: Structure de base des flavonoïde (Krishna et al., 2001).

I.1.3.Méthodes de mesure de la capacité antioxydant

Différentes méthodes in-vitro et in-vivo peuvent être utilisées pour déterminer l'activité antioxydante. Toutefois, seules les méthodes in-vitro seront détaillées. Les mesures spectroscopiques sont majoritairement utilisées en ce qui concerne l'analyse in-vitro des antioxydants. Différentes méthodes, ciblant chacun un mécanisme spécifique peuvent être utilisées. En effet, il y a le DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), le FRAP (ferric-reducing antioxidant power) et l'ORAC (oxygen radical 24absorbance capacity). D'autres existent toutefois, mais seules celles-ci seront détaillées, car ce sont les plus utilisées.

❖ Le test de piégeage du radical libre DPPH

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (**Fig.**) (**Berset C., 2006**).

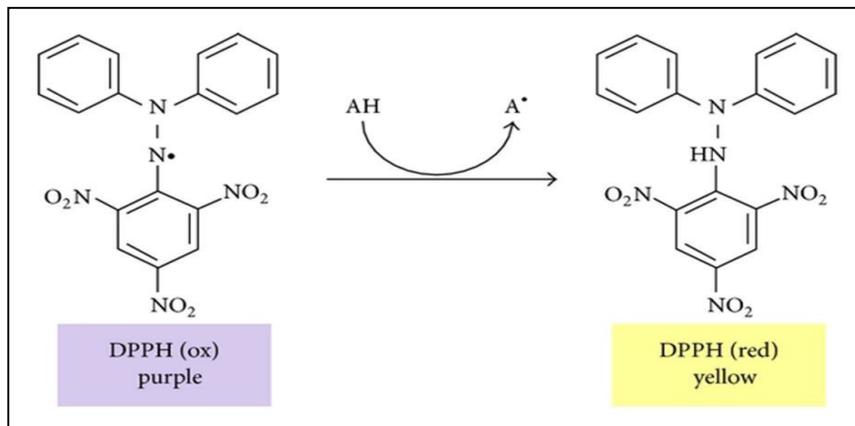


Figure 11 : Réaction du test DPPH d'après (**José Teixeira et al ; 2013**)

I.2.Activité Antimicrobienne

Les antibiotiques et l'hygiène n'ont pas fait disparaître la pathologie infectieuse. La fréquence et le pronostic de certaines ont changé. Mais des nouvelles pathologies infectieuses existent (Avril et al, 1992). Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques évolue (Boughachiche, F, 2012). La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998). Les polyphénols, caroténoïde et les peptides antimicrobiens sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes.

I.1.1.Les principales substances antimicrobiennes

❖ Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

I.1.2.Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits végétaux. Le choix de la méthode dépend de la nature des substances testées. (Guerrin- Fauble et Carret, 1999).

❖ Antibiogramme

Appelée aussi méthode des disques ou méthode par diffusion en milieu gélose; cette technique consiste à utiliser des disques imprégnés de différents extraits à tester, puis les déposer à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec la suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose en laissant des zones vierges autour des disques appelées «zone d'inhibition». Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité de la substance sur le

germe testé, plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible à la substance testée et plus le diamètre est plus petit, plus la bactérie est résistante (Guerrin-Fauble et Carret, 1999).

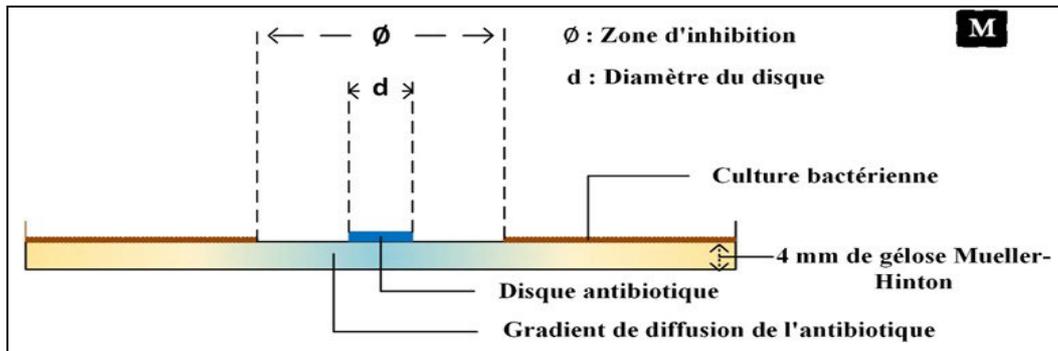


Figure 12 : principe de l'antibiogramme (Alain Gallien 2012)

Chapitre II :
Matériels
et
méthodes

➤ **Contexte et démarche**

La présente étude consiste à évaluer les paramètres physico-chimiques des grains de courge, les propriétés antioxydants et antimicrobiennes des hydrolysats enzymatiques des grains de courges. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes focalisés sur les deux sous-objectifs suivants:

- Détermination des paramètres physicochimiques.
- Calculer le degré d'hydrolyse et de tester l'effet antioxydant et antimicrobien des hydrolysats enzymatique.

➤ **Lieux de travail**

La présente étude a été réalisée au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico Chimiques CRAPC de Bou- Ismail, Tipaza, et aussi au niveau de laboratoire de microbiologie unité bactériologie de Service des maladies infectieuses, Hôpital- BOUFARIK – BLIDA.

II .1.Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est essentiellement constitué des graines de courge (cucurbita pepo ,citrouille). Cette espèce a été choisie parmi celles cultivées en Algérie pour leurs effets thérapeutique et nutritionnelle en tant que graines oléagineuses, leur disponibilité. La récolte de la plante a été réalisée dans une ferme de la région de BIRAR (Tipaza, ALGERIE), le mois de février 2022 .Cet fruit a été bien lavé, coupé, ses graines ont été bien séchées, et bien étiquetées et conservées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation



Figure 13: Les grains de courge (photo originale ,20

II .2.Matériel enzymatique

L'enzyme utilisée au cours de cette étude est donc la Trypsine fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). elle porte le numéro enzymatique EC. 3.4.23.1.

II .3.Microorganisme utilisé

Pour les tests de l'activité antimicrobienne, une gamme des souches pathogène bactériennes et fongique ont été utilisé, Les souches proviennent, pour la plupart de l'American Type Culture Collection (ATCC) ont été fournies par laboratoire de microbiologie unité bactériologie de Service des maladies infectieuses, Hôpital- BOUFARIK – BLIDA-Trois souche pathogène bactériennes ont été testé ; il s'agit de (Staphylococcus aureus ATCC 29213) , Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853) et la souche commensale Escherichia coli (ATCC 25922). et une souche pathogène fongique (leueur : Candida Albican)

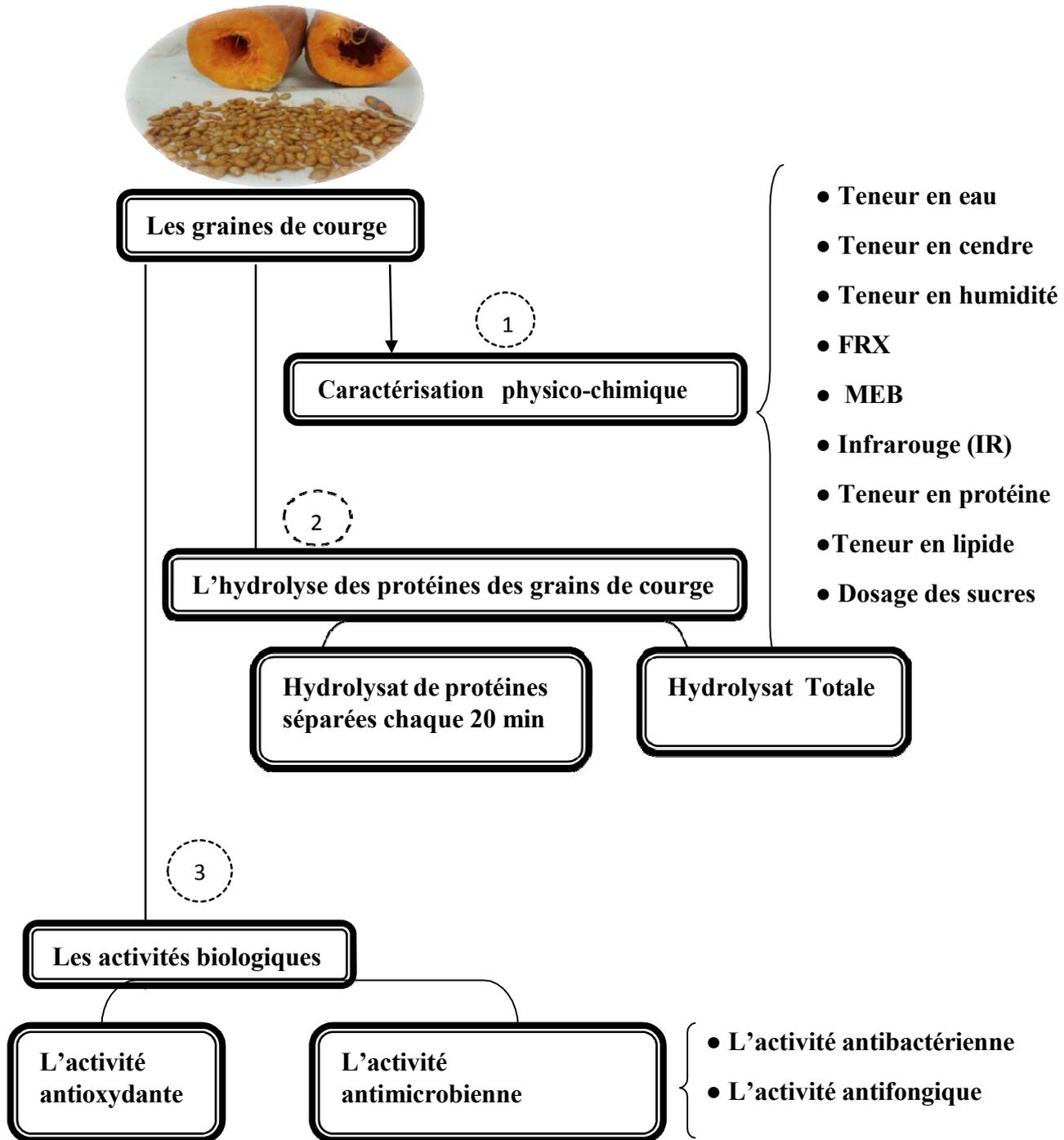


Figure 14 : Schéma du dispositif expérimental utilisé (travail encadré)

II .5.Procéder d’obtention de poudre des grains de courge

Après la récolte, les grains séparés de la chair à l’aide d’une spatule ont été bien lavés à l’eau distillée, légèrement séchés à l’air libre pendant 24h puis dans un étuve à 40°C pendant 48h, jusqu’à la stabilisation du poids.



Figure 15: séchage des grains a l’air libre et a l’étuve

Les grains séchés et décortiqué ont été broyée, à l’aide d’un broyeur électrique, Forplex Brevetes SGD de type 1 N°3139 et tamisées, jusqu’à obtention d’une poudre fine. qui a servi pour la préparation des hydrolysats protéiques Après broyage, la poudre a été conservée dans des flacons, elle a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu’à utilisation

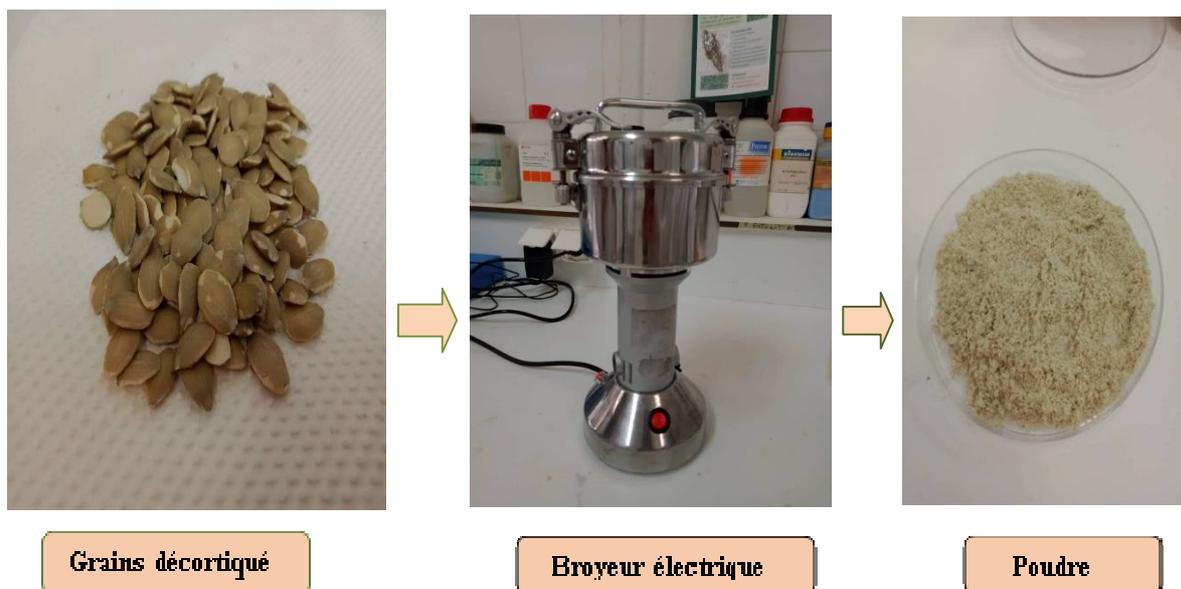


Figure 16 : Procéder d’obtention de poudre des grains de courge

II .6.Caractérisation physico-biochimique de la poudre des graines de courge

➤ Teneurs en humidité (AOAC 2000, n° 930.15)

La teneur en humidité des échantillons est déterminée par méthode gravimétrique. Elle consiste à sécher préalablement dans une étuve les creusets vides pendant 30 minutes à 135°C, et les peser (P 1). Deux grammes (2g) d'échantillon sont déposés (P 2), puis placés dans une étuve à 103°C pendant 2 heures au minimum. Après refroidissement dans un dessiccateur contenant du silicate les creusés sont à nouveau pesés (P 3) et la teneur est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{(-p3)}{(p2-p1)} \times 100$$

Dont :

P 1 : masse en g du vase de tare.

P 2 : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P 3 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

➤ Teneurs en cendres (AOAC 2000, n° 942.05)

Dans un creusé préalablement séché et pesé (A). Deux grammes (2g) d'échantillon sont déposés (m). Les creusets sont alors placés dans une étuve pendant une heure à 103°C, puis dans un four à moufle à 600°C jusqu'à l'obtention des cendres blanches (4 à 5 heures). Les creusets sont refroidis au dessiccateur puis pesés (B), et la teneur est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Tc (\%)} = \frac{(B-A)}{m} \times 100$$

Dont :

Tc : teneur en cendres (%).

A : poids du creuset vide (g).

B : poids du creuset + échantillon après l'incinération. m : masse de l'échantillon (g).

➤ Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux a été fait par la méthode de Dubois et al .1956. La méthode repose sur la mesure de l'intensité de coloration (jaune orange) développée par les sucres en présence de phénol et d'acide sulfurique. Le principe de dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol, il se forme des chromophores de couleur jaune-orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490nm. La teneur en sucres est exprimée en $\mu\text{g} / \text{ml}$ (convertie en grammes / litre) de $\alpha \text{D} (+)$ glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

• Mode opératoire

On additionne à 0,5g d'échantillon, 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,5 M, puis on place l'ensemble dans une étuve réglée à 105°C pendant 3 heures. On transpose la solution dans une fiole de 500ml tout en ajustant le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500ml ; on filtre la solution puis on réalise trois dilutions au 1/3. Dans des tubes, on met 1ml de chaque dilution, ensuite on ajoute dans chaque tube 1ml de phénol à 5 % et 5ml d'acide sulfurique H_2SO_4 à 98 % , Les tubes sont maintenus dans l'étuve pendant 5 minutes à 105°C , puis laissés dans l'obscurité pendant 30 minutes .

• Préparation de la gamme étalon du glucose monohydrate

Une série de tubes à essai a été préparée à partir d'une solution étalon mère à $80\mu\text{g}/\text{ml}$ du glucose monohydrate de la façon suivante : Dissoudre 100 mg soit 0,01 de glucose monohydrate dans 100g d'eau distillée. On prélève de cette solution un volume de 4ml et le complète à 50ml avec de l'eau distillée (ainsi 1ml renferme $80\mu\text{g} / \text{ml}$), on préparer une série de tubes à essais dans lesquels on verse : 0,1, 0,2, 0,3,..... 0,8 de la solution précédente ($80\mu\text{g} / \text{ml}$), On ajuste ensuite les volumes dans chaque tube à essai à 1ml avec de l'eau distillée. On Ajoute à chaque tube, 1ml du phénol à 5% et on agite soigneusement, on ajoute 5ml de la solution de H_2SO_4 concentrée

• Préparation de l'aliquote à analyser

A partir de l'extrait alcoolique obtenu, on prélève 1ml et on ajuste à 100ml avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml. Puis à partir de cette solution on prélève 1ml dans un tube essai on ajoute 9 ml d'eau distillée, la dilution 1/1000 de l'échantillon est ainsi préparée dans un tube à essai, 1ml de la solution à 10^{-3} est additionné de 1 ml de la solution

du phénol à 5% et de 5ml de la solution d' H₂SO₄ à 98% comme est indiqué dans l'étape précédente. La lecture spectrophotométrique se fait dans un spectrophotomètre UV/vis (HELIOS) à la longueur d'onde de 490nm, contre un blanc constitué de : 1ml d'eau distillée, 1ml du phénol à 5% et de H₂SO₄ à 98% en utilisant une cuve de mesure en verre de 1cm d'épaisseur.



Figure 17 : Spectrophotomètre appareil (photo originale,2022)

➤ **Détermination de la teneur en matière grasse : (ISO 659, 1998)**

Les corps gras sont les substances organiques qui peuvent être extraites à partir des fruits et végétaux par des solvants organiques non polaires au moyen de l'extracteur Soxhlet. La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés

• **Mode opératoire**

Sécher les ballons de 250 ml à l'étuve à plus de 80 C° jusqu'à séchage complet, refroidir les ballons aux dessiccateurs pendant 15 mn, peser les ballons à la précision de 0,001 g, peser environ 10 g de poudre et marquer le poids avec précision de 0,001 g, introduire la prise d'essai dans une cartouche de papier filtre, placer les cartouches avec les prises d'essai à l'intérieur du dispositif Soxhlet, verser 200 ml de n- Hexane dans le ballon, chauffer le ballon sur le chauffe ballon pendant 5h30 à 70 C° jusqu'à épuisement de toute matière grasse de l'échantillon, verser de temps en temps quelques ml de solvant n-Hexane dans l'extracteur Soxhlet afin de pousser le siphonage, récupérer les ballons et distiller leur contenu en solvant sous vide à l'aide d'un Rotavapeur , sécher les ballons avec les résidus solides dans l'étuve à 70-80 C° pour éliminer les traces de solvant , refroidir les ballons au dessiccateur pendant 15 min, peser les ballons avec la matière grasse récupérée à la précision de 0,001 g.

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$MG\% = \frac{P2 - P1}{M} \times 100$$

Soit :

P2 : Poids du ballon avec la matière grasse extraite(g).

P1 : Poids du ballon vide (g).

M : Masse de la prise d'essai (g).



(A)



(B)

Figure 18: dispositif Soxhlet (A) , Rotavapeur (B) (photo originale,2022)

➤ Teneurs en protéines

Les Teneurs en protéines sont déterminées selon la méthode de Kjeldahl (AOAC 2000 n° 984.13). Son principe est basé sur le titrage de l'azote ammoniacal après distillation des échantillons préalablement minéralisés :

- 1) Digestion de l'échantillon: basée sur le principe de la minéralisation par voie humide qui consiste à chauffer en présence d'acide sulfurique et d'un catalyseur, l'échantillon protéique pour transformer son contenu azoté en ammoniacque.
- 2) Distillation de l'ammoniac: la distillation est réalisée dans un distillateur semi-automatique en ajoutant 20 ml de soude 35%. L'ammoniacque est récupérée dans une solution d'acide borique 25% contenant réactif de Tachiro comme indicateur coloré.

3) La quantification de l'ammoniaque par titrage avec de l'acide sulfurique 0,05N dans un titreur automatique. La teneur en azote total est déterminée par la relation suivante :

$$N (\%) = (2 * B * V * 14) / P * 100$$

Avec :

B : Normalité de l'acide sulfurique (0,05) .

V : Volume de l'acide sulfurique versé (mL) .

P : Poids de la prise d'essai (g) .

Pour obtenir la concentration en protéines la valeur obtenue est multipliée par 6,25

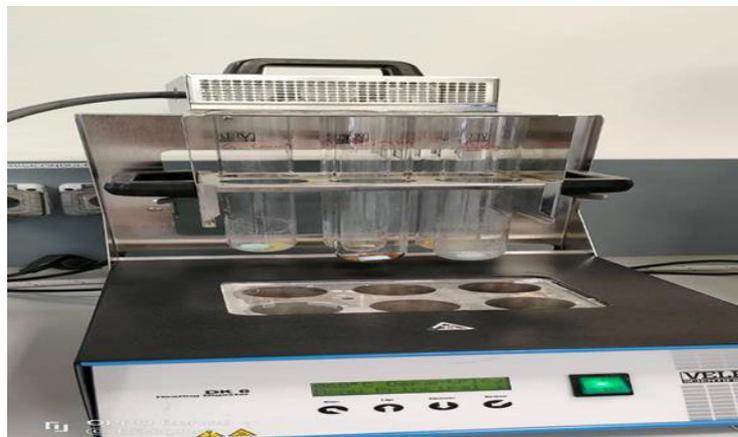


Figure 19 : dispositif de Kjeldahl , (photo originale ,2022

II .7.Analyse spectroscopique des grains

➤ Analyse par fluorescence X

La fluorescence X est une méthode d'analyse spectroscopique de la matière non destructive, elle est utilisée pour la détermination quantitative et qualitative de la composition élémentaire d'un échantillon. L'équipement utilisé est de marque Rigaku type ZSX primus II, à rayons x dispersifs de longueur d'onde (WDXRF) qui comporte un cristal analyseur pour diffracter les rayons X. La longueur d'onde du rayon X impactant et les espacements de la maille de cristal sont reliés par la loi de Bragg ($2d \sin\theta = n\lambda$).

Les rayons X émis par l'échantillon sont collimatés par des lames de métal parallèle (fente de Soller). La lumière de rayons X diffractée par le cristal analyseur est spatialement déployée pour que les photons caractéristiques soient recueillis par un détecteur positionné à un angle précis pour enregistrer l'intensité du rayon X d'un élément spécifique.

➤ Analyse par spectroscopie infrarouge IR

La spectroscopie Infrarouge est une spectroscopie moléculaire d'absorption : la substance étudiée reçoit un rayonnement électromagnétique. Certaines radiations sont absorbées par la molécule. L'examen des radiations absorbées permet d'en déduire des informations sur la structure de la molécule. Pour ce faire, la poudre à analyser est mélangée avec un sel puis comprimée à l'aide d'une presse hydraulique. La pastille est ensuite placée dans l'appareil. Ainsi, l'analyse peut conserver l'intégrité de l'échantillon. Si l'analyse infrarouge est très rapide, peu coûteuse, relativement peu gourmande en échantillon, cette analyse possède tout de même quelques limites. Par exemple, si le but est d'identifier une molécule, il est nécessaire que le produit analysé soit le plus pur possible, ce qui n'est pas toujours facile à obtenir, surtout dans des quantités suffisantes.

➤ Analyse par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique qui fournit des informations à haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe d'interaction électrons-matière. Elle donne des informations sur la topographie de l'échantillon en utilisant les électrons secondaires (SE), la composition chimique via les rayons X et des informations cristallographiques via les électrons rétrodiffusés (BSE). Même si l'étude des défauts cristallins est généralement du domaine du microscope électronique en transmission (MET), il existe une technique intitulée « Imagerie par contraste de canalisation des électrons » (Electron Channeling Contrast Imaging (ECCI)) qui permet l'observation et la caractérisation des défauts cristallins tels que : dislocations, fautes d'empilements, nano macles et champs de déformation élastique dans des matériaux massifs.

• Mode opératoire :

L'échantillon à observer est balayé par un faisceau électronique, des électrons secondaires de très faible énergie sont produits. Ces électrons secondaires sont amplifiés, détectés puis interprétés pour reconstruire une image en fonction de l'intensité du courant électrique produit. Cette méthode réalise donc une topographie de l'échantillon à analyser, il fournit des images en noir et blanc où chaque nuance de gris est fonction de l'intensité du courant détecté.

II .8.Hydrolyse enzymatique des protéines des grains de courge

➤ Délipidation de la poudre des graines de courge

La poudre a été délipidées en présence de n-hexane, environnant 200 mg de la poudre avec 600 ml de n-hexane, dans un bécher sur plaque agitatrice pendant 4 heures puis, on filtre le contenu et le laisser à l'air libre pour évaporer tout le n-hexane.

➤ Déroulement de l'hydrolyse

L'échantillons est placé dans un bécher de 250 ml dont lequel l'hydrolyse va avoir lieu, environnant 10g de la poudre , ensuite on fait une dilution avec 160ml de l'eau distillée. Le mélange est agité à une vitesse constante de 450trs/min, puis il est chauffé à la température optimale d'activité de l'enzyme qui est de 35°C. Pour avoir le milieu basique, qui est le milieu favorable pour l'activité de la trypsine, on ajoute la NaOH jusqu'à l'obtention du pH=8. Quand les conditions d'activité optimale sont atteintes, l'enzyme est ajoutée à raison de 0,1mg/ml au substrat et l'hydrolyse est laissé se dérouler pendant deux heures. le pH du mélange est maintenu constant par addition continue de NaOH durant l'hydrolyse. La stabilité du pH et de la température est contrôlée par un thermo-pH-mètre, des hydrolysats ont été prélevés chaque 10min.



Figure 20: Dispositif de l'hydrolyse enzymatique des protéines des graines de courge,
(photos originales,2022)

➤ Calcule de degré d'hydrolyse (DH)

De nombreux protocoles ont été mis en place pour le suivi de cette hydrolyse. Un des procédés les plus simples est de mesurer les modifications de pH Induites par l'hydrolyse. Cette mesure peut être effectuée directement à l'aide d'un pH-mètre plongé dans le milieu réactionnel, l'hydrolyse ne peut être poussée très loin, l'activité de l'enzyme étant très sensible

aux variations de pH. La mesure peut également être lue de manière indirecte. Pour permettre une action plus longue de l'enzyme, le milieu peut être neutralisé par ajout de soude (lors de libération de H⁺) ou d'acide (libération HO⁻). Le volume versé est directement proportionnel à la quantité de liaisons peptidiques coupées. Cette méthode est la méthode dite du pH-stat (en référence à l'appareil utilisé) (Adler-Nissen - 1986). Selon la méthode pH-stat décrite par Adler-Nissen. Le DH est défini comme suite :

$$\text{DH}\% = \frac{\text{nombre de liaisons peptidiques clivées}}{\text{Nombre total de liaisons peptidiques}} \times 100$$

Les valeurs de DH peuvent être déterminées à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{DH \%} = \frac{\text{B} \times \text{Nb}}{\text{Mp} \times \alpha \times \text{htot}} \times 100$$

Avec :

B = Volume NAOH ajouté (ml) ; **Nb** = Normalité de la soude ; **α** = degré moyen de dissociation des groupements α-NH₂ (Zhao *et al.*, 1996) ; **Mp** = Masse de protéines (Nt*6,25) présent dans le milieu réactionnel ; **htot** = nombre total de liaison peptidiques dans la protéine soit 7,3 eq.g.Kg⁻¹ protéine (Recommandé par Novozymes pour le poisson).

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

$$\text{pK} = 7.8 + \frac{(298 - T)}{298 \times T} \times 2400$$

Avec :

pH= le pH de l'enzyme ; **pK**= le pKa acide des enzymes ; **T**= Températures des enzymes en Kelven (Steinhard and Beychok,1964)

Les hydrolysats protéiques obtenu ont été centrifugés à 5000 trs/min pendant 20 minutes. les surnageant (fraction protéique soluble) récupérées sont ensuite lyophilisées et conservées à -4 °C pour une utilisation ultérieure.

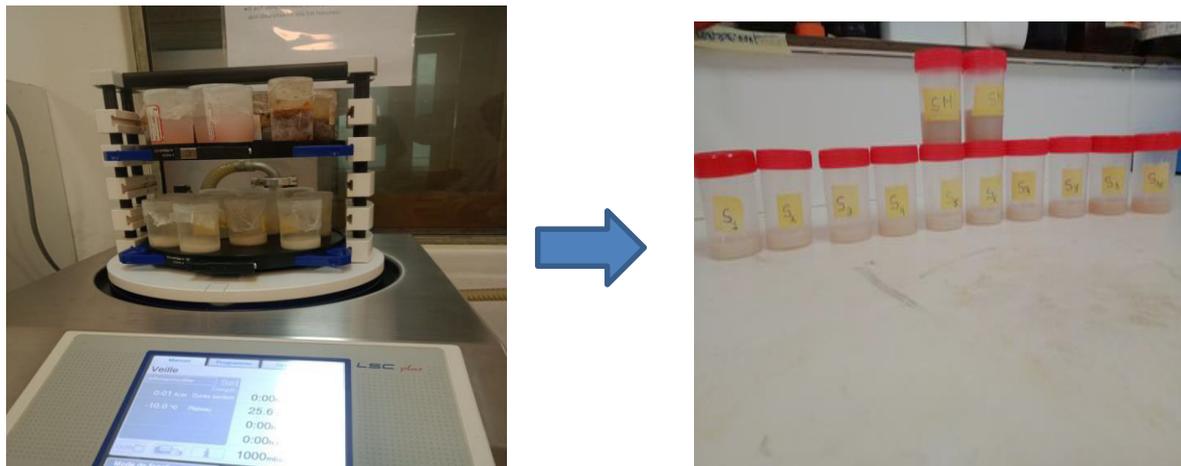


Figure 21 : Lyophilisation des hydrolysats enzymatique (photos originales , 2022)

II .9.Les activités biologiques des hydrolysats

II .9.1.Activité antioxydant

➤ Test au DPPH

• Mode opératoire

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (LopesLutz et al., 2008). Une solution de DPPH a été préparée à 2% dans de l'éthanol, et la solution de l'hydrolysat protéique a été préparée à 10mg/ml dans de l'eau distillée. Un volume de 500 μ L d'hydrolysat protéique à différentes concentrations (0,5 à 10 mg/ml) a été ajouté à 375 μ L d'éthanol absolu et 125 μ L de DPPH éthanolique. Le mélange a été laissé reposer à température ambiante et dans l'obscurité pendant 60 min. L'absorbance (A) a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre (JENWAY/ BUYNOW/ 6715B0), contre un blanc de contrôle qui contient 500 μ L d'eau distillée à la place de l'échantillon, puis il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.



Figure 22: Résultat du test de piégeage des radicaux libres le DPPH.(photo originale ,2022)

II.9.2. Activité antimicrobienne

➤ Étude qualitative

L'objectif de l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique consiste en l'évaluation qualitative des extraits des hydrolysats protéique.

a. Principe

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des extraits des hydrolysats protéique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes (bactéries et levures soumis aux contacts de l'échantillon à tester et ceci par la méthode de diffusion en utilisant des disques absorbants.

b. protocole expérimental

➤ Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture appropriés à cette étude est le milieu Muller-Hinton et le sabouraud préparés comme suit : Dissoudre 21 g de la gélose Muller-Hinton et 65g de la gélose sabouraud dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boites de Pétri.



Figure 23 : Les milieux de culture préparés ,(photo originale,2022)

➤ **Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.



Figure 24 : Stérilisation des milieux de culture et les tubes à essai à l'autoclave
(photos originales,2022)

➤ **Préparation des dilutions d'extrait**

Les extraits d'hydrolysats protéiques ont été dissous dans l'eau physiologique pour préparer les différentes concentrations avec une dilution successive au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.



Figure 25 : Les dilutions d'extrait préparés ,(photos originales,2022)

➤ **Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance.



Figure 26 : L'ensemencement des souches bactériennes dans la gélose

On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son capacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

➤ **Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement

est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile, laisser diffuser sur paillasse 30 minutes, Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour les champignons.



Figure 27: dépôt des disques sur la surface de la gélose inoculée .(photo originale,2022)

➤ **Lecture**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques :

- Présence de zone claire autour du disque : Présence d'activité inhibitrice
- Absence de zone claire autour du disque : Absence d'activité inhibitrice

Chapitre III :

Résultats

III .1.Résultats de la caractérisation physico-biochimique des grains de courge

Les principaux résultants obtenus au cours de cette présente étude feront l'objet de ce chapitre. L'échantillon à analyser était sous forme de poudre, obtenu par le broyage électrique des grains de la courge *cucurbita Pepo* fraîche.

➤ Caractéristiques physicochimique des grains de la courge *Cucurbita Pepo* étudié

La teneur en matière sèche dans la plupart des végétaux varie en fonction de l'humidité relative. Les analyses effectuées montrent que la teneur en matière sèche des grains de courge est de l'ordre de 94.6 %, les grains sont constitué principalement de la matière organique avec un taux de 88.4 % les résultat représenté dans (**l'Annex.**)

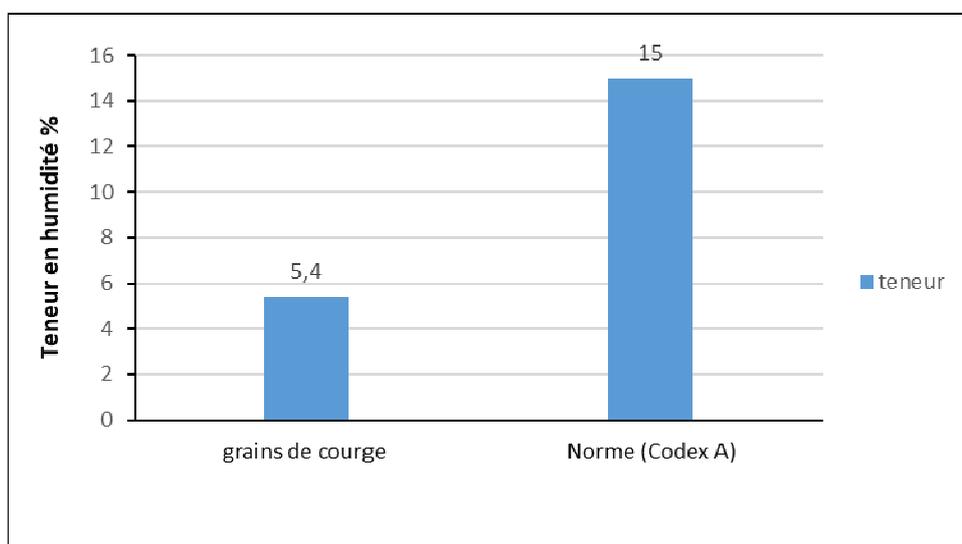


Figure 28 : Teneur moyenne en eau % des grains de courge *Cucurbita Pepo*

Selon le (**Codex Alimentarius, 2019**), les grains des oléagineux ne doivent pas contenir des taux supérieurs à 15% d'eau ; la valeur d'humidité des grains de courge frais testé dans notre étude expérimentale égale à 5.4% correspond à la norme de (**Codex Alimentarius 2019**) d'où la conclusion que les grains de la courge *cucurbita Pepo* ont été bien séchées, et peut être conservées sans crainte de risque de contamination par les microorganismes. ou de l'hydrolyse .

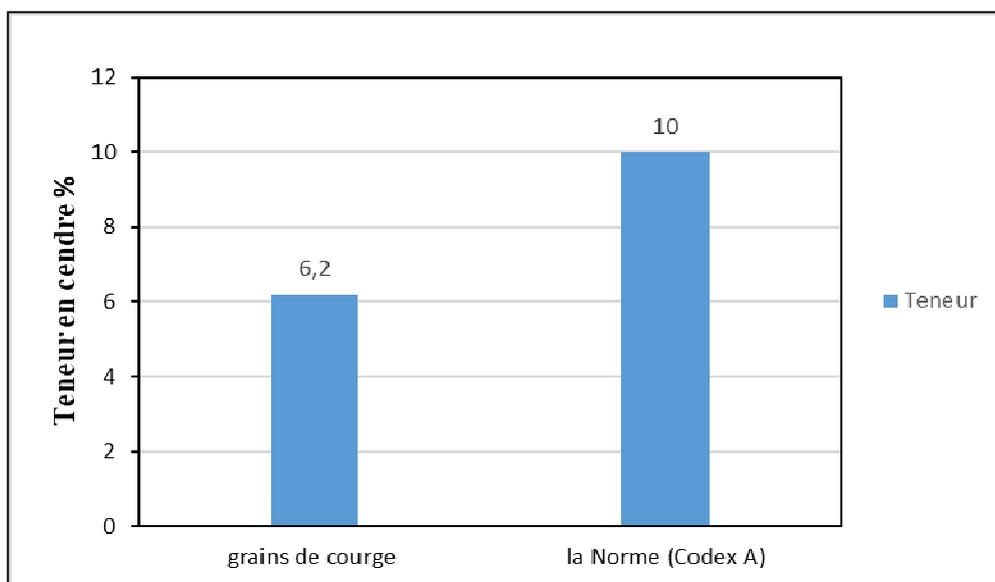


Figure 29 : teneur moyenne en Cendre des grains de courge Cucurbita Pepo

La teneur en cendres de la graine mesurée après minéralisation à 600°C égale à 6.2 ±. (Concorde de la norme **Codex Alimentarius, 2019**) Ce résultat correspondant à la fraction en sels minéraux et en composants inorganiques de la graine est supérieure de celle trouvé par (**Dominguez et al., 1994**) égale a 3,8 g / 100 g de graines Notant ici que plusieurs facteurs pourraient influencer la teneur en eau et en matière sèche des plantes comme la nature des fibres, l'âge des plantes, l'état du sol et la durée de conservation du végétal après la récolte (**Bachiri et al., 2016**) .

➤ **Caractérisation biochimique des grains de courge *cucurbita Pepo* étudié**

• **Teneur en Sucre totaux**

LOMS a définis les sucres totaux comme la somme de tous les sucres à l'état naturel Dans la présente étude la teneur en sucres totaux a été effectué par la méthode de phénol (**Dubois et al ;1956**) la quantité de sucres totaux est exprimée en (mg EG) équivalent de glucose à l'aide d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution de glucose (D+) de concentration 8 mg/ml .

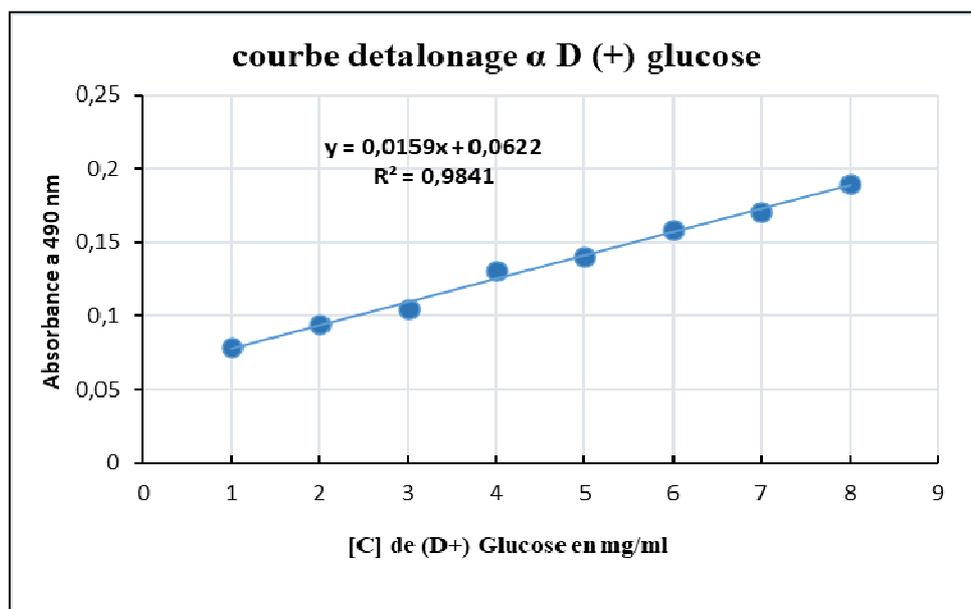


Figure 30 : la courbe d'étalonnage de glucose

La concentration en sucre totaux dans notre échantillon de grains de courge est de 1.02 ± 1 mg/ml la teneur en sucre totaux égale à 1.18 % Ms les grains ont donné un faible rendement en sucre cela est confirmé par le gout non sucré des grains de courge , cette valeur concorde avec les recommandations du **U.S. Département of Agriculture (USDA) 2015–2020** et la (Compilation des auteurs canadienne- **Nutrition de 2015**) qui il ont estimé que la valeur des sucres totaux des grains oléagineuse est inférieure à 5% Ms .

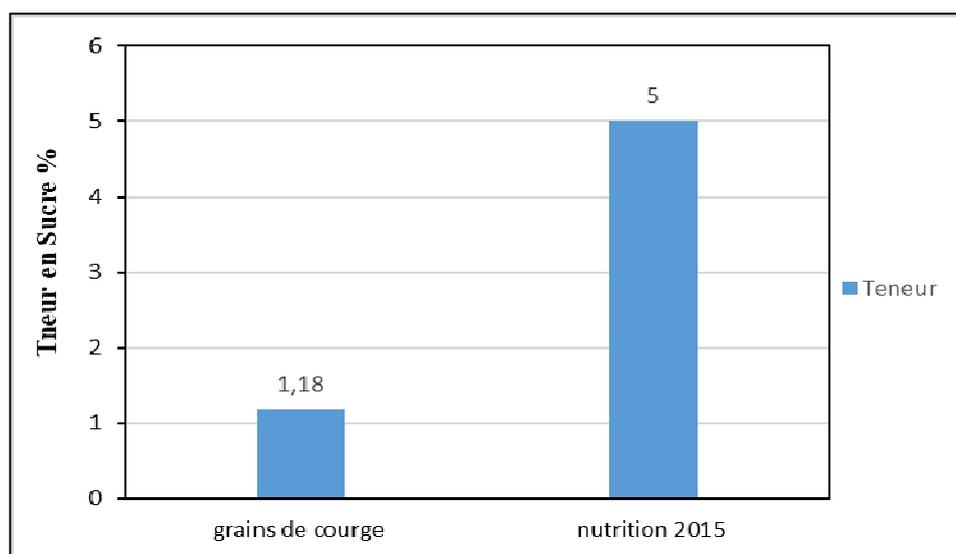


Figure 31 : Teneur moyenne en sucre de la grain de courge *cucurbita Pepo*

➤ Extraction et Teneur en lipide totaux

D'après (Goetz & Le Jeune, 2010) les grains de courge sont riches en matière grasse principalement en acide gras (AG); selon notre étude expérimentale l'huile des graines de courge de *cucurbita Pepo* a été extraite par la méthode de Soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant. le rendement, obtenu après 7 cycle d'extraction égale à $46,6 \pm \%$ selon la norme (Codex Alimentarius 2019) pour les grains oléagineuse, le taux de la matières grasse ne doit pas être inférieure à 30 %

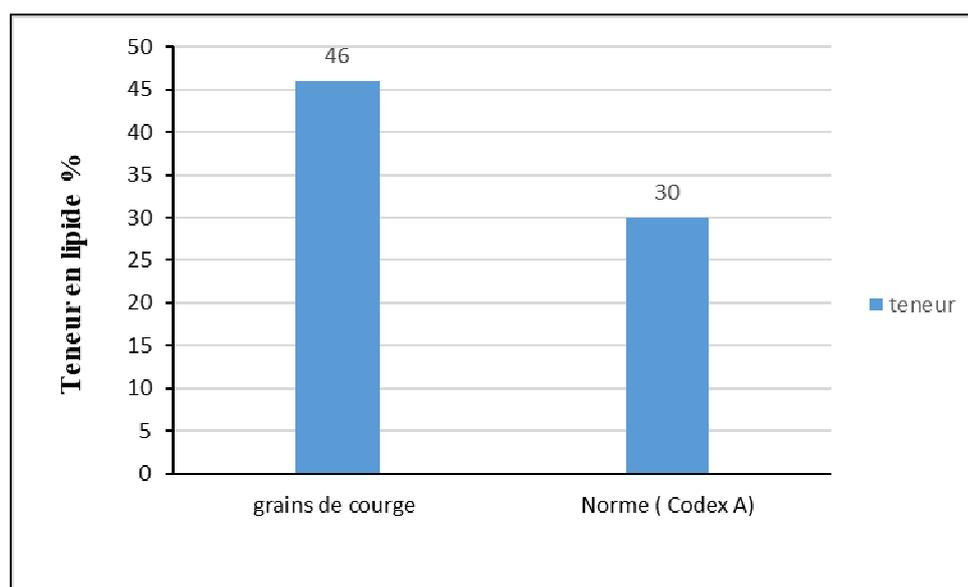


Fig 32 : Teneur moyenne en lipide Totaux des grains de courge *Cucurbita Pepo*

➤ Teneur en protéines totale

L'analyse de la teneur en azote par micro titration (Méthode de Kjeldahl) a permis d'évaluer la teneur en protéines à $30,7 \pm 0,2 \%$ le facteur de conversion protéique utilisé est de 6,25 (Rozan, 1997) quoique discuté par certains auteurs. Ce résultat est nettement supérieur à celui de Domínguez et al., 1994 qui évaluent la teneur en protéines de la graine à 23,4% mais se rapprochent des résultats de Bell, 1984 et 2001 qui estime cette teneur à des valeurs allant de 25 à 30%.

Ce résultat peut s'expliquer par la variabilité de la composition de la graine, liée à la variété cultivée, à son environnement, aux conditions agro-climatiques, ainsi qu'à ses prédispositions génétiques, voire au facteur de conversion utilisé qui surévaluerait légèrement la quantité de protéine présentes.

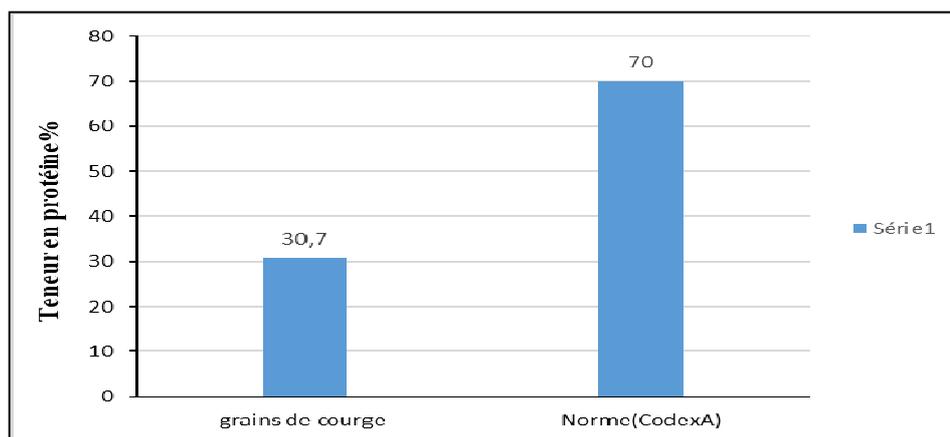


Figure 33: Teneur moyenne en protéine des grains de courge *cucurbita Pepo*

III .2.Résultat des analyses spectroscopique

➤ Evaluation des Analyse spectrale par infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres obtenus sont des spectres typiques de grains de la courge *cucurbita Pepo* ;avant et après l'hydrolyse enzymatique la spectroscopie IR permet d'identifier la présence de certains types de liaisons au sein des grains de courge elle permet d'en déduire la nature des groupes caractéristiques de cette molécule En effet, elle est utilisée pour déterminer le degré d'insaturation, l'état d'oxydation, les doubles liaisons trans et la présence des impuretés (García-González, Baeten, Pierna, et Tena, 2013)

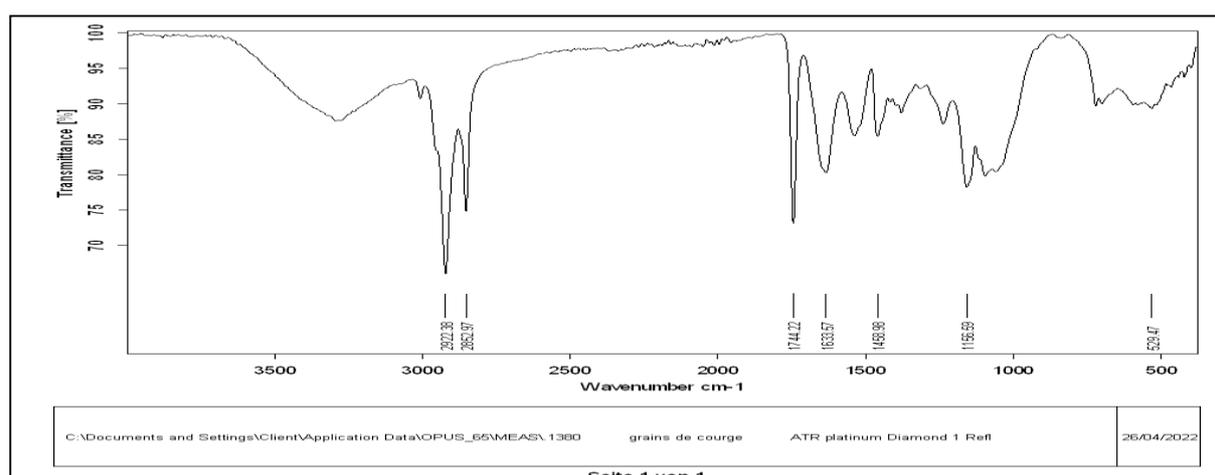


Figure 34: spectres IR des grains de courge *cucurbita Pepo* avant l'hydrolyse enzymatique.

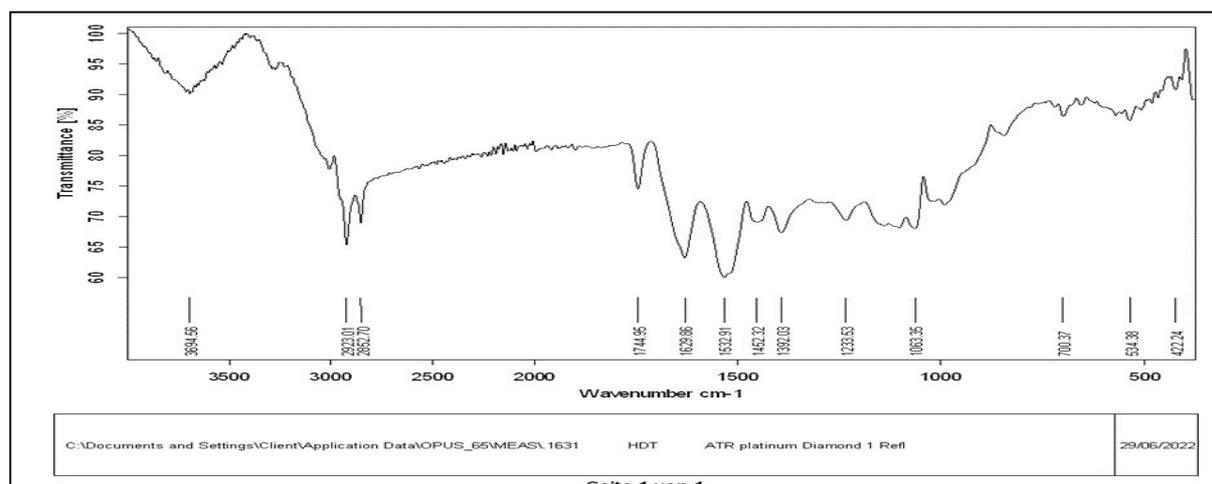


Figure 34 : spectre IR des hydrolysats protéique des grains de courge *cucurbita Pepo* après hydrolyse enzymatique totale

- La bande vers 3694-3500 cm^{-1} , élongation du groupement amide de la liaison N-H l'intensité de cette bande nous renseigne sur le degré de saturation de nos grains
- les bandes d'absorption relativement fortes situées vers 2922 et 2652 cm^{-1} sont attribuées à l'élongation de la liaison C-H des groupements -CH₂-et -CH₃-. Qui sont les constituants des chaines des acides gras.de la grain
- Les spectres exhibent également une bande d'absorption intense vers 1744 cm^{-1} caractéristique du groupement carbonyle des esters,
- Une bande d'absorption relativement moyenne vers 1633 cm^{-1} caractéristique du groupement Amine N-H des acides Aminé libres.
- La bande d'absorption moyenne vers 1458 cm^{-1} ; élongation du groupement ester de la liaison C-O
- Une bande située autour de 1156 cm^{-1} , caractéristique de la liaison C-O
- Une bande de vibration hors plan « empreinte digitale » des groupement -CH- situé vers 700 cm^{-1}
- Une bande de vibration hors plan moyenne des groupement C-X situé vers 529 et 700 cm^{-1}
- Une bande de vibration hors plan, complexe située vers 422 cm^{-1} .

Les spectres sont presque identiques, cependant quelques petites différences sont détectables en fonction du traitement enzymatique on peut citer celle de la bande 3694 des amide N-H, et celles de la région 700-422 cm^{-1}

➤ Evaluation des Analyse spectral par fluorescence X (FRX)

La fluorescence X est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée dans la présente étude pour la détermination quantitative et qualitative de la composition élémentaire des grains de courge

Les taux des éléments essentiels constituant les graines de la courge *cucurbita Pepo* sont déterminés par fluorescence X et représentés dans le (**tableaux7.**) Le résultat montre des niveaux variables de Macro et de micro éléments essentiels à l'utilisation de ces poudres.

Tableaux 07 : les constituant minérale de grains de la courge *Cucurbita Pepo* déterminer par FRX

Résultats		
Echantillon : GC		Date d'analyse : 08.07.2022
	Type d'Echantillon : Oxyde/Poudre	
No.	Elément	Résultats (% massique)
1	Mg	5.1806
2	Al	0.0717
3	Si	0.1392
4	P	25.2241
5	S	13.8801
6	Cl	1.3817
7	K	45.2735
8	Ca	4.3791
9	Mn	0.6088
10	Fe	1.7613
11	Cu	0.3486
12	Zn	1.5834
13	Rb	0.1077
14	Sr	0.0602

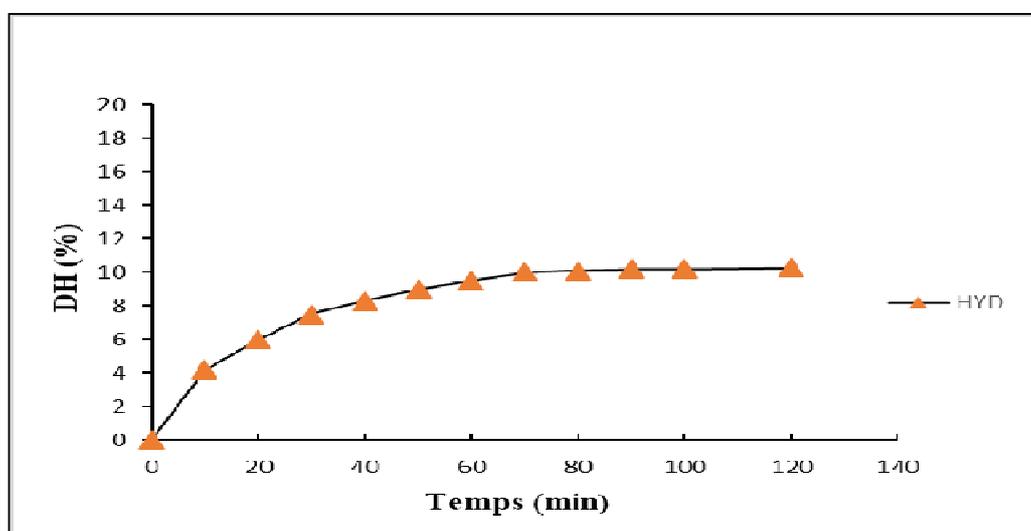
Selon les résultats représentés dans le (**tableau 07**), nous constatons que nos grains de courge présentent des teneurs appréciables en potassium (k) ; phosphore (p) ; sulfure(S) ; Magnésium (Mg) et calcium (Ca) égale à (45.2 % 25.2% et 13.8 % 5.18% 4.37 %) respectivement par a port a sa faible teneur aux autre élément présente dans le tableau cette différence pourrait être lié à la variété utilisé.

III .3.Résultat d'hydrolyse enzymatique des grains de courge

III .3.1.Evolution de Degré d'hydrolyse

Dans le cadre de ce travail, L'hydrolysats des protéines de graines de courge *Cucurbita Pepo* a été préparé par traitement avec de la trypsine pendant 2h dont l'activité optimale de l'enzyme se situent à un **pH = 8** et **T°= 40 C** .

Une cinétique d'hydrolyse est réalisée en effectuant des prélèvements chaque 10 min d hydrolysats la méthode de pH-stat est couramment utilisée pour contrôler la réaction d'hydrolyse enzymatique. la variation du degré d'hydrolyse au cours de la réactions montré Dans la figure



HYD : hydrolysats protéiques

Figure 35 : évolution du degré d'hydrolyse des protéines de grains de courge *cucurbita Pepo* avec la Trypsine dans les conditions, optimale T 40 C°, pH 8, E / S 1 % en fonction de temps

La figure montre une évolution du degré d'hydrolyse en fonction du temps la courbe indique une phase de croissance rapide de l'hydrolyse pendant les premier 40 min de la réaction, Après 1 h la vitesse d'hydrolyse diminue et la cinétique devient asymptotique

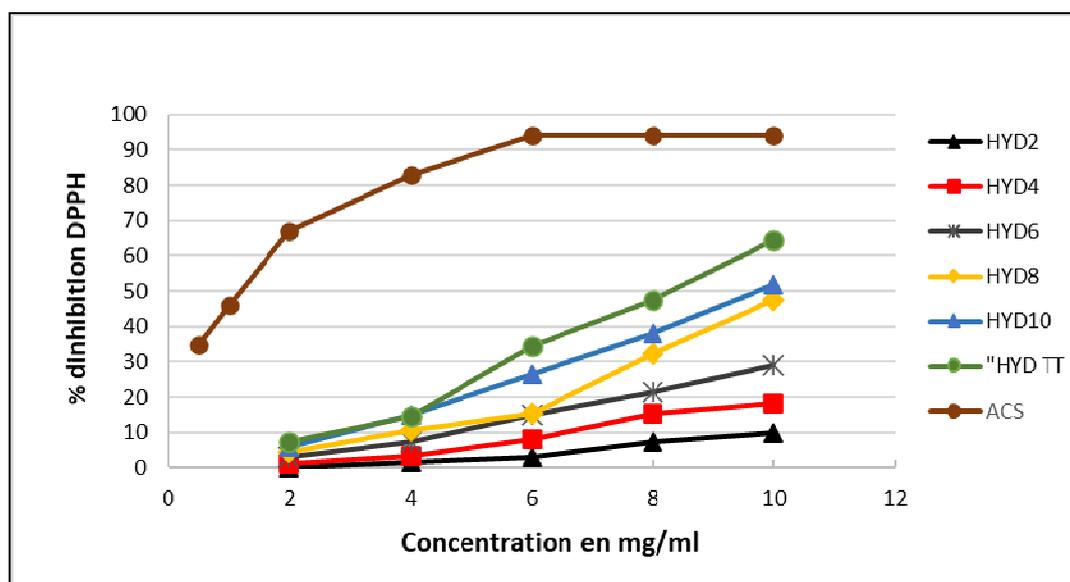
En ce qui concerne la cinétique d'hydrolyse nous constatant que le DH maximal obtenu après 2h d'hydrolyse est de 11 %,

III.4. Propriété biologique d'hydrolysats protéiques des grains de courge

III.4.1. Evaluation de l'activité antioxydant par Teste de piégeage du DPPH

L'activité antioxydant de l'hydrolysats protéiques des grains de courge (*Cucurbita Pepo*) étudiés a été évalués par le test de piégeage du radical DPPH ; l'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant de référence

Les graphes ci-dessous représente les variations de pourcentage du pouvoir piégeage des radicaux libres (DPPH) en fonction de la concentration mg/ml



HYD : Hydrolysats enzymatique après 20 , 40 ,60 80 , 100 min d'hydrolyse ; HYD TT: Hydrolysats totale après 2h

Figure 36 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique et de l'hydrolysats

Tableau08 : Valeurs des IC50 des différents hydrolysats protéiques des grains de courge

Hydrolysats protéiques	HYD8	HYD10	HYDTT	ACS
IC50 (mg/ml)	10 ± 0.08	9.7± 0,06	8.1 ± 0.11	1.8 ± 0.02

D'après les résultats obtenus, tous les hydrolysats protéiques présentent une faible activité inhibitrice vis-à-vis du radical DPPH par rapport au standard (acide ascorbique). En effet, les pourcentages d'inhibition pour les hydrolysats protéiques HYD2 ; HYD4, HYD6, HYD8 , HYD10, HYDTT, ainsi que l'acide ascorbique sont de $18.16 \pm 3,01\%$, $29.23 \pm \%$ $47,5 \pm 1,73\%$, $52 \pm 0,98\%$, $64,54 \pm 0,69\%$ et $94.21 \pm 3.52\%$ respectivement .

D'après la (**figures36**) , nous remarquons que l'activité anti radicalaire donnée par l'hydrolysats totale (HYD TT) issu après 2 h d'hydrolyse trypsique est plus élevée que celle donnée par les autres hydrolysats

III .4.2.Evaluation de l'activité antimicrobienne des hydrolysats protéiques des grains de courge (*Cucurbita Pepo*)

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des hydrolysats protéiques des grains de courge (HYD2 , HYD4 , HYD6, HYD8 , HYD10 ,HYDTT) issus après (20,40,60,80,100 min et 2h d'hydrolyse trypsique) respectivement par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons , L'activité antimicrobienne des hydrolysats a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques **Derwich et al.,(2010)** contenant les hydrolysats à tester vis-à-vis de (4) germes Pathogènes dont (3) bactéries Gram + et Gram - (Staphylococcus aureus ATCC 29213, E. coli ATCC 25922; P. aeruginosa ATCC 27853) et une fongique (Candida Albican) .

Après l'incubation, de 24 h on a récupéré les boîtes de pétries et on obtient les résultats qui sont sur la (**figure 387**) la présence de zone d'inhibition indique un résultat positif qui est observée autour des disques imprégnés d'hydrolysats protéiques produisant des antimicrobiens actifs contre les souches bactériennes testées. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée.

L'absence de zones d'inhibition claires des disques indique un résultat négatif qui montre que les bactéries (Gram+ et Gram-) et la souches fongiques sont résistantes à la molécule qui est l'hydrolysats. Plus cette zone est grande, plus l'activité antimicrobienne est importante .

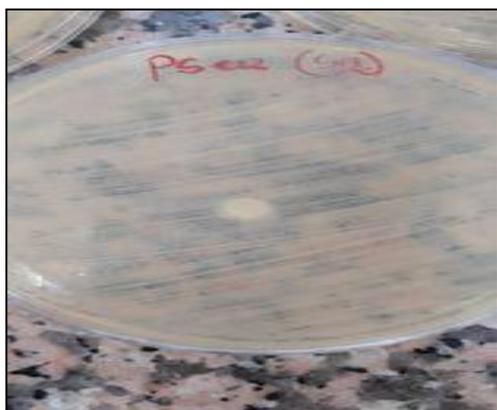
Tableau10 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibition obtenus

Souches bactériennes	Diamètre de la Zones d'inhibition en mm selon les hydrolysats					
	Protéiques des grains de courge (<i>Cucurbita Pepo</i>)					
Et fongique	HYD2 Après 20 min	HYD4 Après 40min	HYD6 Après 60min	HYD8 Après 80 min	HYD10 Après 100 min	HYDTT Après 2h
E. coli ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
S. aureus ATCC 29213	-	-	5mm +	6mm +	17mm +	16mm +
P. aeruginosa ATCC 27853	-	56 mm +++	-	7mm +	10mm +	54 mm +++
Candida albicans	-	-	-	-	-	-

HYD : hydrolysats protéique après (20,40,60,80,100 min d'hydrolyse tripsique) , **HYDTT** : hydrolysats totale après 2 h d'hydrolyse , (-) ; pas d'inhibition ; (+++) : Action inhibitrice très efficace

Les résultats sur les propriétés antimicrobiennes dans ce test, présenté dans le **(tableau 10)** et la **figure (37)**, ont montré que l'hydrolysate enzymatique des grains de courge (*Cucurbita Pepo*) a une influence inhibitrice différente sur les souches bactériennes,

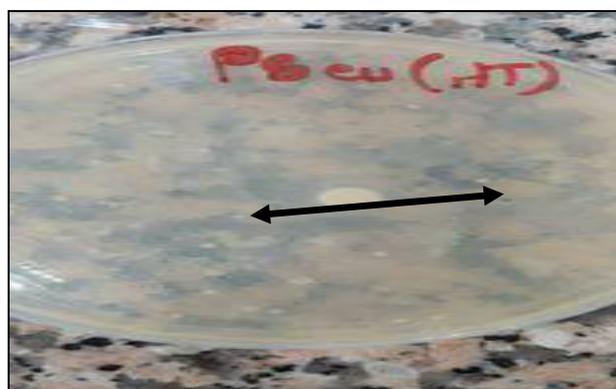
L'hydrolysate a montrée des diamètres d'inhibition compris entre $5 \pm 3,54$ et $56,5 \pm 2,12$ mm .L'activité inhibitrice de l'hydrolysate enzymatique la plus élevée était enregistrée avec *P. aeruginosa* ATCC 27853, dont on a obtenu un diamètre d'inhibition de $56 \pm 2,12$ mm et $54 \pm 3,53$ mm pour les hydrolysate (HYD4 et HYDTT) respectivement ce qui traduit la forte sensibilité de cette bactérie suivi par la souche bactérienne (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) qui a enregistré un diamètre d'inhibition de l'ordre de 17 ± 0 mm. pour hydrolysate enzymatique totale (HYDTT) alors qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de la souche *Candida albicans* et La bactérie *Escherichia coli*



Pseudomonas aeruginosa
(HYD2 , ZI= 0)



Pseudomonas aeruginosa
(HYD4 ; ZI= 56 mm)



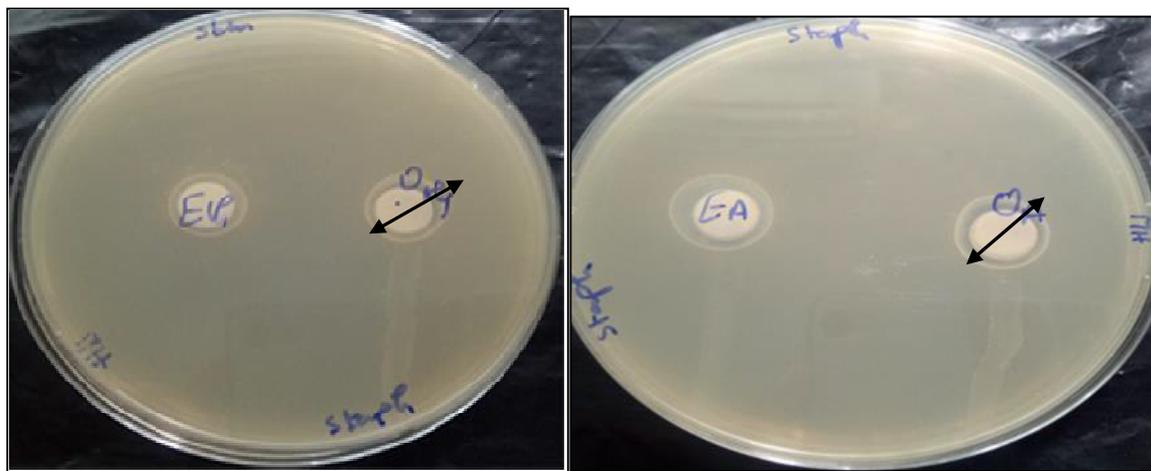
Pseudomonas aeruginosa (HYDTT , ZI= 54 mm)



Pseudomonas aeruginosa
 ZI= 0)

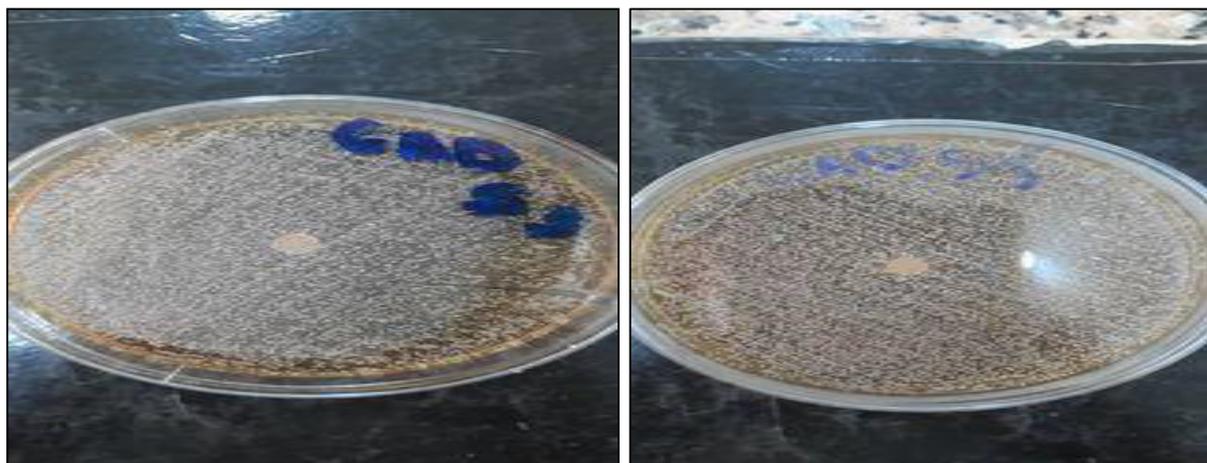
Pseudomonas aeruginosa
 (HYD8 , ZI = 7mm)

Pseudomonas aeruginosa (HYD6,
 (HYD10, ZI= 10 mm)



Staphylococcus aureus
 (HYD 10; ZI= 16mm)

Staphylococcus aureus
 (HYD TT ; ZI = 17mm.)



Candida albicans

Candida albicans

Aucune zone d'inhibition ZI= 0 pour toute les HYD

*Escherichia coli**Escherichia coli*

Aucune zone d'inhibition $ZI=0$ pour toute les HYD

Figure 37 : Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'hydrolysat protéique par la méthode de diffusion en disque

Chapitre IV:

Discussion

Dans le but de rechercher les différents peptides bioactifs dans les grains de courge *cucurbita Pepo* une caractérisation physico-chimique a été réalisé indiquer dans le **Tableau 1 (Annex)**.

Une analyse globale de la graine, ayant pour but de définir l'ensemble des caractéristiques de cette dernière, a tout d'abord été réalisée. Cette détermination de l'ensemble des composants en présence a permis de régler un certain nombre de paramètres expérimentaux tels que l'ajustement de la concentration en enzymes, le ratio solide / eau. D'autre part, une bonne connaissance du substrat de l'étude a aidé à mieux comprendre et appréhender les mécanismes survenant au cours du procédé d'hydrolyse enzymatique

la détermination de la teneur en eau et très important d'autant plus quelle est un facteur essentiel dans la conservation des grains ; les grains oléagineuse présente des teneur en eau variant entre 3 a 15 % selon la norme (**codex Alimentarius 1999**) ; pour notre échantillon la teneur en eau égale a 5.4 ± 0.02 correspond a celle de la norme (**codex Alimentarius 1999**) est proche à celui d **EVON 2008** égale a 7.49 ± 0.03 % pour les grains de tournesol

D'après les travaux réalisés par **Wangcharoen et Morasuk. (2007)** et **Jacobo-Valeuzuela et al. (2011)**, les résultats obtenus concernant le taux d'humidité pour la variété *Cucurbita moschata* (Decne) récoltée en chine et au Mexique sont égaux à $86,21 \pm 2,15\%$ et $85,90\%$ respectivement. Ces taux sont largement supérieurs à nos résultats, cette différence est probablement due à la variété analysée, origine géographique et le stockage car une conservation prolongée peut provoquer une déshydratation du grain

L'analyse des cendre ou matières minérale des grains de courge *cucurbita Pepo* présenté dans la (figure 30) donne une teneur de 6.2 ± 0.03 % cette valeur légèrement supérieur des teneur en cendre de grain de colza (**3-4 %**) (**MC Kevith ;2005**) et de grains de Tournesol (**3.11%**) (**Evion 2008**)

Selon **Ayerdi Gotor (2008)** les composés minéraux dans les grains oléagineuse varient selon les espèces végétales ; au sien d'une même espèce selon les géotypes de plus l'expression du potentiel génétique sera conditionnée par le contexte de la culture à savoir les condition

environnementale (sol ; régime hydrique ; séquence climatique ; les condition culturale (date de semis, irrigation, ...).

Le pourcentage élevé en matière grasse trouvé dans la présente étude est égal à 46 ± 1.16 % faits de cette dernier un important potentiel dans les industrie des huile cette valeur est proche de celle trouvé par (**Badr et al., 2011**) qui donnent une valeur égale à 47.03 % et largement supérieur à celle de (**Gliemmo et al., 2009**) qui égalé a 4.09 g/100g pour la variété *Cucurbita moschata* Toutefois nos résultats restent supérieurs à ceux trouvés par **Lambert (2005)** dans le coton et le soja, respectivement 20% et 16-18%.

Ces résultats montrent que la teneur en lipide totaux varie au sein de la variété de la courge, la partie étudiée ; le solvant et la méthode d'extraction utilisé Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différents solvants et de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études

L'analyse de la composition biochimique des grains de courge *cucurbita Pepo* révèle une teneur importante en protéine (**fig34.**) de l'ordre de 31%. Ce résultat concorde de ceux rapporter par la bibliographie

En effet **Dash et al (2016)** ont trouvé des taux de protéines de l'extrait brut des grains de courge de l'ordre de 105.3 mg/ml ; tandis que **Ziaul Amine et al (2019)** ont rapportés une valeur de 21% qui est inférieur de celle de notre étude

Selon les résultat obtenu de la caractérisation biochimique des grains de courge *cucurbita Pepo* nous constatons que les grains de courge accumule essentiellement deux type de substrat de réserve , les protéines et les lipides représente respectivement environ 30% et 40%.De la matières sèche des grains .

L'hydrolyse enzymatiques des protéines de grains de *cucurbita Pepo* a été réalisée par une protéase commerciales ; (la trypsine) Un hydrolyse rapide a été observée dans les 40 premières minutes. Ensuite, un taux d'hydrolyse plus lent a été trouvé jusqu'à 120 min (**Fig36**). .En effet, pour la première étape où la vitesse de réaction est élevée, correspond à une rupture facile des liaisons peptidiques. Dans la deuxième étape le taux de réaction est réduit en raison de l'hydrolyse de liaisons peptidiques plus compactes

En ce qui concerne la cinétique d'hydrolyse nous constatant que le DH maximal obtenu après 2h d'hydrolyse enzymatique est de 11 %, cette valeur est concorde à celle trouvé par [Filho et al., 2020]. Muhamyankaka et al. [2013] qui ont rapporté un DH de 6-14% des hydrolysats de protéines de pépins de courge.

Selon [22], le degré d'hydrolyse (DH) est significativement influencé par les conditions d'hydrolyse qui comprennent le temps, la température, le pH du substrat et de l'enzyme utilisée dans l'hydrolyse ainsi que la concentration d'enzymes utilisées.

.Le faible degré d'hydrolyse obtenu dans la présente étude (DH= 10%) pourrait être attribués à la spécificité de l'enzymes utilisé (trypsine) sur les chaînes peptidiques de protéines des grains de courge , une inhibition peut se produire en raison de l'oxydation des lipides ou de la présence d'impuretés autres que les protéines, ou d'une augmentation des peptides qui agissent à leur tour comme des concurrents efficaces du substrat en raison de protéines non digérées ou partiellement digérées.

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante des hydrolysats enzymatiques des grains de courge *Cucurbita Pepo* vis-à-vis du radical DPPH présenté dans la (fig37)

Cette figure montre que tous les hydrolysats enzymatiques de grains de courge présente une activité antioxydante modéré contre le radical libre DPPH[•] .qui, selon le graphe, augmente en fonction de la concentration. L'acide ascorbique possède une capacité antioxydante très importante obtenue pour une concentration de 10 mg/ml. Tandis que, l'hydrolysat protéique révèle une activité inférieure montrée pour la même concentration.

Selon les résultats montrés dans la (fig37) Le pourcentage d'inhibition maximal enregistré pour l'hydrolysat totale (HYDTT) et de l'acide ascorbique à 10 mg/ml de concentration est de l'ordre de $64,54 \pm 0,69\%$ et $94.21 \pm 3.52\%$ respectivement

Les résultats présentés dans tableau 8 de l'activité antiradicalaire des hydrolysat protéiques de grain de la courge *cucurbita Pepo* montrent un IC50% d (HYDTT) = 8.1 ± 0.11 mg/ml, une valeur largement supérieure que celle enregistrée pour l'acide ascorbique qui est de: IC50% = 0.19 ± 0.02 mg/ml Comparant ces résultats, il est à suggérer que l'hydrolysat protéique à une capacité antioxydante considérable mais reste faible par rapport au standard (l'Acide ascorbique)

Le résultat obtenu indique que l'hydrolysate enzymatique de grains de courge contient certains peptides donneurs d'électrons et qui pouvait réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et mettre fin à la réaction en chaîne radicalaire (**Wu et al., 2003, Abdelhedi et al., 2016**). Cela a été expliqué par **De Pooter et al. (1986)** qui ont démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique réduisent et décolorent le DPPH à des concentrations faibles en raison de leur immense capacité à céder l'hydrogène.

Les substances antimicrobiennes sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et d'autres agents antibactériens et antifongiques. Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs synthétiques, la recherche des additifs naturels, a notamment augmenté ces dernières années

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de l'hydrolysate enzymatique des grains de courge on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

Les résultats sur les propriétés antimicrobiennes dans ce test, présenté dans **le tableau**,... ont montré que l'hydrolysate enzymatique de grains de courge a une influence inhibitrice différente sur les souches bactériennes et fongiques, dans l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que : la souche *P. aeruginosa* est la plus sensible vis-à-vis de l'hydrolysate (activité antimicrobienne forte). Tandis que la souche *Candida albicans* et la bactérie *Escherichia coli* apparaissent comme la souche la plus résistante

L'hydrolysate a montré des diamètres d'inhibition compris entre $5 \pm 3,54$ et $56,5 \pm 2,12$ mm. L'activité inhibitrice de l'hydrolysate enzymatique la plus élevée était enregistrée avec la souche *P. aeruginosa* dont on a obtenu un diamètre d'inhibition de $56 \pm 2,12$ mm ce qui traduit la forte

sensibilité de cette bactérie, suivi par la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* qui a enregistré un diamètre d'inhibition de l'ordre de $19 \pm 2,83$ mm. alors qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de souche *Candida albicans* et *Escherichia coli* qui apparaisse comme les souche les plus résistantes. Selon (**Kontiza, et al. (2008)**). la grande sensibilité de *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* pourrait être due à la structure de la membrane et de la paroi cellulaire extérieure. La résistance importante de la bactérie *Escherichia coli* pour nos hydrolysats enzymatiques des grains de courge pourrait probablement être attribuée à leurs membranes extérieures qui entourent la paroi de la cellule et qui limitent la diffusion des composés hydrophobes par les lipopolysaccharides de couverture.

Par contre, pour les bactéries Gram (+), l'absence de cette barrière permet le contact direct des constituants des composés phénoliques isolés avec les phospholipides bicouches de la membrane cellulaire, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité aux ions et le passage des constituants ou une altération des systèmes enzymatiques bactériens intracellulaires vitaux

Conclusion

Conclusion

La présente étude avait pour but de mettre en évidence le potentiel de procéder de l'hydrolyse enzymatique des protéines de grains de la courge cucurbita Pepo a généré des peptides biologiquement actifs.

Le procédé de valorisation a fait appel à l'utilisation des enzymes notamment des protéases, véritables outils biotechnologiques qui préservent les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des grains de courge

L'ensemble des essais réalisés au cours de ce travail permet de conclure que l'hydrolysate Protéique obtenu par voie enzymatique présente un grand intérêt dans une vaste gamme d'applications industrielles , pharmaceutique et médicale notre étude a porté sur l'évaluation de son pouvoir antimicrobien, antifongique et même son pouvoir antioxydant.

Les principaux objectifs poursuivis dans ce travail ont été atteints :

Le premier objectif porte sur la caractérisation physico-chimiques des grain de courge qui révèle des teneur Importante en protéine environ 31 % de protéines et une teneur en lipides pouvant atteindre 46 % par rapport au poids sec. Par la suite, la réaction d'hydrolyses enzymatiques a été testées avec de la trypsine, afin d'optimiser la teneur en protéines dans la poudre de grains de courge cucurbita Pepo.

Le deuxième objectif reposait sur la détermination du pouvoir antimicrobien de l'hydrolysate contre les souches pathogène par la méthode de diffusion en disque . L'activité inhibitrice de l'hydrolysate protéique totale la plus élevée était enregistrée avec *Pseudomonas sp* avec un diamètre d'inhibition de $56 \pm 2,12$ mm ce qui signifie , que cette bactérie c'est la plus sensibles, alors que la plus faible pour hydrolysate totale a été noté avec *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de $5 \pm 3,54$ mm ce qui traduit la forte résistance de cette bactérie. Tandis qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de la souche *Candida albicans* et *Escherichia Coli* qui apparaisse comme les souches les plus résistantes. Ce résultat montre une activité antimicrobienne considérable.

Conclusion

Le troisième objectif qu'était basée sur la détermination du pouvoir antioxydant de hydrolysât, protéiques totale des grain de courge selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré des valeur d IC50 égale à 8.1 ± 0.11 mg/ml comparant avec l'acide ascorbique. égale a ± 0.02 .

Les résultats obtenus a permet de conclure que L'hydrolysât protéique ont des activités antioxydants modéré mais reste faible devant l'activité de l'acide ascorbique.L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de l'hydrolysât, celui-ci présente un pouvoir antimicrobien, et antioxydant assez attirant. A cet effet nous préconisons d'exploiter les propriétés de l'hydrolysât protéique de grains de courge *cucurbita Pepo* dans le domaine médical, pharmaceutique, cosmétique et même dans le domaine de la nutrition.

Références bibliographique

A

- **Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A. et Avallone, S.** (2010). Kinetic study of β -Carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 349-361.
- **Adler-Nissen, J.** 1986 (a). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. London. **Adler-Nissen, J.** 1986 (b). Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures, chap. 4 : 97 - 122. In : Protein tailoring for food and medical uses. (Eds.) **R. E. Feeney and J. R. Whitaker**, USA, New York.
- **Adrian J., Potus J. et Frangne R.** (1995). La science alimentaire de A à Z. 2eme Ed. Tec et Doc. Lavoisier. 477p.
- **Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., & Agboola, S. O.** (2013).
- **Ana M. Rojas** (2009). Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin- enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poirét). *J. Food Eng.* 93: 293–301.
- **Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. et Simal-Gandara, J.**(2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640.
- **Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O. and Azizah, M.** (2009). Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *Int. Food Res. J.* 16: 45-51.

B

- **Badr SE., Shaaban M., Elkholy YM., Helal MH., Hamza AS., Masoud MS., et al.**
- **Balti R, Brkia A, Bougateg A, Ktari N, Nasri M** (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Food chemistry*, 113: 146-154.

- **Barakat LA, RH Mahmoud** (2011) The anti-atherogenic, renal protective and immunomodulatory effects of purslane, pumpkin and flax seeds on hypercholesterolemic rats. *North American Journal of Medical Sciences* 3(9): 411-417.
- **Bartley, G. E. et Scolnik, P. A.** (1995). Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell*, 7, 1027-1038
- **Benachour K.** (2008). Diversité et activité pollinisatrice des abeilles (Hymenoptera : Apoidea) sur les plantes cultivées. Thèse de doctorat en science, spécialité : entomologie appliquée, Université Mentouri de Constantine. 150p.
- **Bendich, A. et Shapiro, S. S.** (1986). Effect of β -carotene and Canthaxanthin on the Immune Response of the Rat. *The Journal of Nutrition*, 116, 2254-2262.
- **Biochemical, and functional properties.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,
- **Blecker, C., et al. (2015).** Purification and identification of novel antioxidant peptides
- **Britton, G.** (1989). Carotenoid Biosynthesis — An Overview. *Carotenoids*. N. I. Krinsky, M. Mathews-Roth et R. Taylor, Springer US 167-184.
- **Britton, G.** (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- **Britton, G., Liaaen-Jensen, S. et Pfander, H.** (2008). Special Molecules, Special Properties. *Carotenoids*.
- **Brown, J. E., Khodr H., Hider, R. C. et Rice-Evans, C.** (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions. *Biochem. J.* 330: 1173-1178.
- **Bruneton, J.** (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème édition. Tec&Doc. Paris
- **Burton, G. et Ingold, K.** (1984). -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 4649, 569-573.
- **Burton, G. W. et Ingold, K. U.** (1984). -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.

C

- **Caili F., Huan S. et Quanhong L.** (2006). A review on pharmacological Activities and Utilisation Technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*.61:73-80.

- **Cao M J, Osatomi K, Suzki M, Hara K, Tachibana K, Ishihara T** (2000). Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of Carp, *Fish Science*, 66: 172-1179.
- **Carvalho de Lucia Maria Jaeger, Patrícia Barros Gomes, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Sidney Pacheco, Pedro Henrique Fernandes do Monte, José Luiz Viana de Carvalho, Marília Regini Nutti, Ana Cristina Lima Neves** (2012) . Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Res. Int.* 47 : 337–340.
- **Chaux C. et Foury C.** (1994). Productions légumières : légumineuses potagères, légumes fruits, Tome 3, Technique et documentation, Paris, 563 p.
- **Chaux C. et Foury C.** (1994). Productions légumières : légumineuses potagères, légumes fruits, Tome 3, Technique et documentation, Paris, 563 p.
- **Cheong NE, YO Choi, WY Kim, Bae IS, Cho MJ, et al.** (1997) Purification and characterization of an antifungal PR-5 protein from pumpkin leaves. *Journal of Molecular Cell* 7(2): 214-219.
- **Chung KH, KO Shin, HJ Hwang, KS Choi** (2013) Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. *Journal of Nutrition Research Practices* 7(2): 82-88.
Cucurbita pepo convar. citrullina var. styriaca. *Phytothérapie.* 8:136-140

D

- **Dacosta, Y.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris.
- **De-vecchi S D, Coppes Z** (1996). Marine Fish digestive proteases relevance to food industry and south-west Atlantic region a review. *Journal of Food Biochemistry*, 20:193-214.

E

- **El Gharras, H.** (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.
- **El Mosallamy AE, AA Sleem, OM Abdel Salam, N Shaffie, SA Kenawy** (2012) Antihypertensive and cardioprotective effects of pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food* 15(2): 180-189.
- **Elqaj M, Ahami A. et Belghyti D.** (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

- **Escalada de Marina F. Pla, Carmen A. Campos, Lía N. Gerschenson, Ana M. Rojas** (2009). Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. *Journal of Food Engineering* 92 : 361–369.

F

- **Fakourelis, N., Lee, E. C. et Min, D. B.** (1987). Effects of Chlorophyll and β -Carotene on the Oxidation Stability of Olive Oil. *Journal of Food Science*, 52, 1, 234-235.
- **Farombi E.O.** (2003). African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *J. biotech.* 2(12): 662-671.
- **Fissore Eliana N., Nora M. Ponce, Eva A. Wider, Carlos A. Stortz, Lía N. Gerschenson, G. Britton, S. Liaaen-Jensen et H. Pfander.** **Basel-Boston-Berlin, Birkhäuser Verlag.** 4, 1-6. *Food Reviews International*, 29(3), 231-260 from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*, 12, 516-525.

G

- **Gagnon J., Riopel-Meunier J. et Riverain M.** (2007). *Encyclopédie libre: Courge.*
- **Gee, J.M. et Johnson, I.T.** (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 1-182,
- **Gliemmo M.F., Latorre M.E., Gerschenson L.N., Campos C.A.** (2009). Color stability of pumpkin (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) puree during storage at room temperature: Effect of pH, potassium sorbate, ascorbic acid and packaging material. *LWT Food Sci. Technol.* 42 : 196–201.
- globulins from selected Cucurbitaceae seeds used as antidiabetic medicinal plants in Africa *BMC Complementry and Alternative Medicine* 13: 63.
- **Goetz P., Le Jeune R.** (2010), *Matière médicale pratique : Huile de graine de courge,*
- **Gossell Williams M, A Davis, N O'Connor** (2006) Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of Sprague- Dawley rats by pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food* 9(2): 284-286.

- **Gossell Williams M, C Hyde, T Hunter, D Simms Stewart, H Fletcher, et al.** (2011) Improvement in HDL cholesterol in postmenopausal women supplemented with pumpkin seed oil: pilot study. *Climacteric* 14(5): 558-564.

H

- **Hammer KA, CF Carson, TV Riley** (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86(6): 985-990.
- **Hong H, CS Kim, S Maeng** (2009) Effects of pumpkin seed and saw palmetto oil in Korean men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Nutrition Research Practices* 3(4): 323-327. <https://courges.ca/histoire-de-la-courge> Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum*

J

- **Jian L, CJ Du, AH Lee, Binns CW** (2005) Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer. *International Journal of Cancer* 113(6): 1010-1014.
- **Junxin Wua, Zhijian Changa, Qingshan Wub, Haixian Zhanc, Shulian Xiea** (2011). Molecular diversity of Chinese *Cucurbita moschata* germplasm collections detected by AFLP markers. *Sci. Hort.* 128 :7–13.

K

- **Kalogeropoulos N, A Chiou, MS Ioannou, VT Karathanos** (2013) Nutritional evaluation and health promoting activities of nuts and seeds cultivated in Greece. *International Journal of Food Science and Nutrition* 64(6): 757-767.
- **Kishimura H, Hayashi K** (2002). Isolation and characteristics of trypsin from pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132B: 485-490.
- **Klomklao S** (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30 (1): 37-46.
- **Klomklao S, Benjakul S** (2017). Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107: 1864-1870.
- **Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson B K, Saeki H** (2006). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology part B BiochemistryMolecular Biology*, 144: 47-56.
- **Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A.** (2000). Fish protein hydrolysates: Production,

L

- **Lendenmann, J.**(2013). La courge Un légume aux multiples vertus. Vista. 45.

M

- **Makni M, H Fetoui, NK Gargouri, M El Garoui, N Zeghal** (2011) Antidiabetic effect of flax and pumpkin seed mixture powder: effect on hyperlipidemia and antioxidant status in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes Complications* 25(5): 339-345.
- **Makni M, H Fetoui, NK Gargouri, M Garoui, H Jaber, et al.** (2008) Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry Toxicology* 46(12): 3714-3720.
- **Makni M, M Sefi, H Fetoui, M El Garoui, NK Garouri, et al.** (2010) Flax and pumpkin seeds mixture ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Food Chemistry and Toxicology* 48(8-9): 2407-2412.
- **Malesev D.et KunticV.,** 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoids complexing reactions. *Journal*
- **Marambe, P.,** Shand, P. J., & Wanasundara, J. P. D. (2008). An In-vitro
- **Mueller, L. et Boehm, V.** (2011). Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. *Molecules*, 16, 1055-1069.

N

- **Noelia Jacobo-Valenzuela, Maróstica-Junior Mario Roberto, Zazueta-Morales José de Jesús, Gallegos-Infante José Alberto** (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of Cucurbita moschata Duchense vs. Cehualca. *Food Res. Int.* 44 : 2587– 2593. of the Serbian chemical society. vol.c 72, n.10,p.p. 921-939.

O

- **Olusola, A.O., Ekun, O.E. (2018).** Alpha-Amylase inhibitory properties and in vitro antioxidant potentials of cowpea seed protein hydrolysates. *AASCIT Communications*, 6(1), 1– 12
- **Oussou K.R, Yolou S.F, Tue Bi B, Kanko C, Boti J.B, Ahibo C et Casanova J.** (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de Ocimum gratissimum (Lamiaceae). *Europ. J. Sci. Res.* 40(1): 50 -59.
- **Oussou K.R, Yolou S.F, Tue Bi B, Kanko C, Boti J.B, Ahibo C et Casanova J.** (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de Ocimum gratissimum (Lamiaceae). *Europ. J. Sci. Res.* 40(1): 50 -59.
- **Ozenda P.,** (1977). Flore du Sahara, Ed. CNRS. PARIS, France, 250-259.

P

- **Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C. A.** (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* 30: 62-153.
- **Pahud Y., Tardy M. et Meldem M.** (2006). *Courge: citrouille et potiron.* Edition Cabedita.2-22p.
- **Pahud Y., Tardy M. et Meldem M.** (2006). *Courge: citrouille et potiron.* Edition Cabedita.2-22p
- **Palozza, P., Serini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E. et Calviello, G.** (2003). Prooxidant effects of [beta]-carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 6, 353-362.
- **Park SC, JR Lee, JY Kim, Hwang I, Nah JW, et al.**(2010) Pr-1, a novel antifungal protein from pumpkin rinds. *Biotechnology Letters* 32(1): 125-130.
- **Park, D.-K.** (1994). Antioxidant Activity of β -carotene Related Carotenoids of Peroxyl Radical Mediated Lipid Peroxidation. *Korean Biochemistry Journal*, 27, 6, 479-483.

pepo L.) cultivated in Egyptian habitats. *Nat Prod Res.* 25(16):1524-1539.
- **Pierce, J. P., Natarajan, L., Sun, S. et al, e.** (2006). Increases in Plasma Carotenoid Concentrations in Response to a Major Dietary Change in the Women's Healthy Eating and Living Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 1886-1892.
- **Polèse J.M.** (2006). *La culture des courges.* Edition Artemis.10-76p.report on *Cucurbita pepo L., semen.*44p.

R

- **Rozan P., Lamghari R., Linder M., Villaume C., Fanni J., Parmentier M., Méjean L.** (1997). In vivo and in vitro digestibilité of soybean, lupine, and rapeseed meal proteins after various technological processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1762-1769

S

- **Schaefer and Renner** 2011 in European medicines agency, 20112. Assessment
- **Sylla KSB** (2011). Valorisation de coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) par hydrolyse enzymatique : Application en nutrition avicole. Thèse de doctorat en Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, Bretagne sud, 80 p.

T

- **Tavano, O.L. (2013).** Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis and Biological Enzymology*, 90, 1–11
- **Technological and Bioactive Functionalities of Canola Meal Proteins and Hydrolysates.**
- **Teugwa CM, T Boudjeko, BT Tchinda, PC Majiata, D Zofou (2013)** Antihyperglycaemic
- **Tossi A., Tarantino C., Mitaritonna N., Rocco G., Romeo D. (1997).** Design of antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. In *Peptides – Frontiers of peptide Science, Proceedings of the 15th America Peptide Symposium*, Nashville, Tennessee, U.S.A., Ed. J.P. Tam and P.T.P. Kaumaya

U

- **Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2012).** Food protein-derived bio active peptides; Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11–R24
- **usitatissimum L.) Proteins. Journal of the American Oil Chemists Society**, 85(12), 1155-

V

- **Vanier P. (2007).** La citrouille au fil du temps, Usages culinaires, Conservation, Jardinage biologique, Ecologie et environnement.
- **Voranunt SS, C Yarnnon, P Ngunboonsri (1987)** The effects of pumpkin seeds on oxalacrytafluria and urinary compositions of children in hyperendemic area. *American Journal of Clinical Nutrition* 45(1): 115- 121.

W

- **Wang, X.-D. et Russell, R. M. (1999).** Procarcinogenic and Anticarcinogenic Effects of β Carotene. *Nutrition Reviews*, 57, 9, 263-272.

X

- **Xie JM (2004)** Induced polarization effect of pumpkin protein on B16 cell. *Fujian Medical University Acta* 38: 394-395

Z

- **Zaineddin AK, K Buck, A Vrieling, J Heinz, D Flesch Janys, et al. (2012)** The association between dietary lignans, phytoestrogen-rich foods, and fiber intake and postmenopausal breast cancer risk: a German case– control study. *Nutrition and Cancer-journal* 64(5): 652- 665.
- **Zhao, D. and H. Negishi,** The 1996 Kobe earthquake: Seismic image of the source zone

and its implications for the rupture nucleation, *J. Geophys. Res.*, 103(B5), 9967–9986, 1998.

- **Zhou T, Q Kong, J Huang, R Dai, Q Li (2007)** Characterization of Nutritional Components and Utilization of Pumpkin. *Global Science Books 1*: 313- 321.
- **Zhu, K.X., Zhou, H.M., Qian, H.F. (2006)**. Antioxidant and free radical scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with Alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296–1302

Annexes

► **Préparation des milieux de culture :**

Milieu Gélose Nutritive « GN »

Ingrédients :

- Amidon.....10g
- extrait de Peptone..... 5g
- extrait de viande..... 1g
- levure.....2g
- NaCl..... 5g
- Agar.....15g
- Eau distillée..... 1L
- PH=7.5

Préparation :

- Suspendre 28 grammes dans 1 litre d'eau distillée .
- Chauffer à ébullition pour dissoudre complètement le milieu .
- Stériliser par autoclave à une pression de 15 lb (121 °C) pendant 15 minutes.
- Après l'autoclave, laisser refroidir à 45-50 °C.

La **gélose nutritive GN** est un milieu d'isolement non sélectif.

Milieu Gélose Mueller-Hinton « MH »

Ingrédients :

- Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5g
- Extrait de viande.....2,0g
- Amidon..... 1.5g
- Calcium..... 20 à 25 mg
- Magnésium.....10 à 12,5 mg
- Agar.....15g
- pH = 7,4 +/- 0,2
- Eau distillée.....qsp 1L

Préparation :

- Suspendre 21 grammes de milieu déshydraté
- 18 grammes d'agar .
- 1 litre d'eau distillée.
- Stériliser par autoclave à une pression de 15 lb (121 °C) pendant 15 minutes.
- Après l'autoclave, laisser refroidir à 45-50 °C.

La **gélose Mueller Hinton** est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion (méthode Kirby-Bauer)

Milieu de culture sabouraud « SAB »

Ingrédients :

- Peptones... 10,0 g
- Glucose (ou Dextrose)...40,0 g
- Agar... 15,0 g
- pH = 5,6
- Eau distillée..... qsp 1 L

Préparation :

- Suspendre 65 grammes de milieu déshydraté
- 20 grammes d'agar .
- 1 litre d'eau distillée .
- Stériliser par autoclave à une pression de 15 lb (121 °C) pendant 15 minutes.
- Après l'autoclave, laisser refroidir à 45-50 °C.

Le milieu gélosé de **Sabouraud** est un milieu sélectif pour la culture fongique et principalement utilisé pour l'isolement des dermatophytes, des levures et de divers autres champignons pathogènes et non pathogènes.



Figure A :Les milieux de cultures préparés

► **Appareillage ,solvant et réactifs utilisés :**

Les équipements et les produits utilisés au cours de nos travaux sont de qualité analytique .(Tableau A.1)

Tableau A .1 : Réactifs, solvants et appareillage utilisés .

Appareillage	Solvants et réactifs
✓ une balance de précision	✓ n-hexane
✓ une étuve	✓ éthanol
✓ une plaque chauffante réglable	✓ acétone
✓ un chauffe ballon	✓ phénol
✓ Un spectrophotométrie	✓ glucose monohydrate
✓ Un lyophilisateur	✓ acide sulfurique
✓ Un pH-mètre	✓ acide borique
✓ Un autoclave est un stérilisateur à vapeur	✓ H2So4
✓ Un étuve de séchage	✓ NaOH
✓ Un dessiccateur	✓ DPPH
✓ Un agitateur	
✓ Une centrifugeuse	



spectroscopie infrarouge IR



Microscopie électronique a balayage



Spectroscopie X



Centrifugeuse



Étuve



Fourre a moufle



Balance a précision



Autoclave



La hôte



Dessiccateur

► Résultats de la caractérisation physicochimique des grains de courge *cucurbita pepo*

Tableau A.2 : Caractéristiques physicochimique des grains de la courge Cucurbita Pepo étudié

<u>Paramètre biochimique</u>	<u>Grains de courge (% MS)</u>
Teneur en Humidité %	5.4 ±
Teneur en Cendres %	6.2 ±
Matière sèche %	94.6
Matière organique %	88.4

