

F.S.D..... N° D'ordre :

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb de Blida
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
BERDAMANE Cherifa
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Extraction des lignanes à partir des graines de *Linum*
usitatissimum et *Sesamum indicum*.
Etude de l'activité biologique**

Soutenu publiquement en Juin 2016 devant le jury composé de :

M. EL HATTAB	Pr	Président	Université de Blida
R.Zahi	MCB	Examineur	Université de Blida
K. BOUTEMAK	MCB	Promotrice	Université de Blida

Promotion 2015-2016

Remerciements

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme BOUTEMAK Khalida, Maître de conférences qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

J'exprime ma profonde gratitude à tous les ingénieurs du Laboratoire de Chimie notamment Mme Asma, Monsieur Aissa ainsi que Melle Amina pour m'y avoir accueillie durant la réalisation de ce travail.

Un remerciement chaleureux et sincère à Mme W. TOUAFEK, S. KASMI, N. BOUZIDI et Mme Y. DAGHBOUCHE et à Mr M. EL-HATTAB, qui ont fournis beaucoup d'efforts durant tout le long du cycle Master.

Je réserve une attention toute particulière à toute l'équipe de laboratoire d'hygiène de Blida de m'avoir donné toutes facilités quant à la réalisation de l'étude de l'activité antimicrobienne.

A tous les étudiants de Master de la promotion 2016.

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.

DEDICACE

Je dédie ce travail

À mes Parents

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude Pour leur soutien tout le
long de mes études

À mes Frères

À ma nièce Sanaa et mon neveu Zaid

Que j'aime profondément, que dieu les protège.

À mes Amies

À tous ceux qui me sont chers

Cherifa

ملخص

هذا العمل يهدف الى استخراج و تقييم النشاط المضاد للأكسدة و المضادة للميكروبات للقشور لبذور الكتان و السمسم الذي تم استخراج بطرق مختلفة : النقع , و استخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية , استخراج بمساعدة السيلولوز, استخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية-التحليل الانزيمي, استخراج بمساعدة التحليل الانزيمي- الموجات فوق الصوتية.

اظهرت النتائج ان المستخلص الذي تم استخلاصه بمساعدة السيلولوز هو الذي اعطى افضل مردود (15.75%) و هذا بالنسبة لبذور الكتان, اما بنسبة لبذور السمسم فكان عن طريق استخلاصه بمساعدة التحليل الإنزيمي- الموجات فوق الصوتية (1.98%).

اما بخصوص نتائج التركيز بوليفينول الاجمالي فقد تم الحصول على افضل تركيز عن طريق استخراج الموجات فوق الصوتية لكلا النوعين و قد اظهرت النتائج ايضا ان مستخلصات بذور الكتان تحتوي على نسبة تركيز بوليفينول من مستخلصات بذور السمسم.

اظهر النشاط المضاد للاكسدة للمستخلصات مع الجذر الحر DPPH انها جيدة.

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات مع عدة سلالات حيث بينت النتائج ان السلالات ابدت حساسية ضعيفة مع المستخلصات.

الكلمات المفتاحية: بذور الكتان, السمسم, الاستخراج, قشور, الانزيم, والموجات فوق الصوتية, ومضادات الأكسدة, مضادات الميكروبات, DPPH.

Résumé

Ce présent travail a pour objectif l'extraction et l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des lignanes à partir des graines de *Linum usitatissimum* et de *Sesamum indicum*. extraits par les différents procédés : macération, extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par cellulase, extraction par ultrason-assistée par hydrolyse enzymatique et extraction assistée par hydrolyse enzymatique –ultrason. Les résultats ont montré que le meilleur rendement d'extraction des lignanes (15.75%) a été obtenu avec l'extraction assistée par la cellulase avec les graines de *Linum usitatissimum* et pour les graines de *Sesamum indicum*, le meilleur rendement est (1.98%) obtenu par extraction assistée par hydrolyse enzymatique/Ultrasons. La teneur des polyphénols totaux des extraits des lignanes ont montré que la meilleur teneur en polyphénols était obtenu avec l'extraction par Ultrasons pour les deux espèces, la teneur des polyphénols totaux dans les extraits de *Linum usitatissimum* (2.7975 ± 0.09 mgEAG/g d'extrait) plus élevées par rapport dans les extraits de *Sesamum indicum* (1.7 ± 0.06 mgEAG/g d'extrait). L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que les lignanes présentaient une bonne activité antioxydante. Les résultats des tests d'activité antimicrobienne a montré que les lignanes présentaient une faible activité vis-à-vis les souches testées.

Mots clés : *Linum usitatissimum*, *Sesamum indicum*, extraction, les lignanes, enzyme, ultrasons, antioxydante, antimicrobienne.

Abstract

This work aims to extract and evaluate of the antioxidant and antimicrobial activity of lignans from seeds of *Linum usitatissimum* and *Sesamum indicum*. extracted through by different processes: maceration, ultrasound-assisted extraction, cellulase assisted extraction, extraction by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis and enzymatic hydrolysis assisted extraction - ultrason. The results showed that the best extraction yield of lignans (15.75%) was obtained with assisted extraction cellulase with *Linum usitatissimum* seeds and for the *Sesamum indicum* seeds best yield is (1.98%) by extraction by enzymatic hydrolysis -ultrason assisted. However, the results of the concentration of total polyphenols crude extracts of lignans have shown that the best polyphenol content was obtained by ultrasound extraction for both species, the content of total polyphenols in extracts of *Linum* higher by report in extracts of *Sesamum indicum*. The evaluation of the antioxidant activity by scavenging free radical DPPH method showed that lignans exhibited good antioxidant activity. The results of the antimicrobial activity tests showed that lignans showed a low vis-à-vis the strains tested activity.

Keywords: *Linum usitatissimum* , *Sesamum indicum*, extraction, lignans, enzyme, ultrasound, antioxidant, DPPH, antimicrobial.

Liste des abréviations

AAR : Activité Antioxydante Relative;

Abs : Absorbance;

CE₅₀ : Concentration Effective nécessaire pour donner une absorbance égale 0,5;

CCM : Chromatographie sur Couche Mince;

°C : Degré Celsius;

DPPH : 2,2-Diphénylpicrylhydrazyl;

EN : Extraction par hydrolyse enzymatique

EXT : Extrait;

FC : Folin-Ciocalteu;

g : Gramme;

I : Inhibition;

IC₅₀ : Concentration d'Inhibition requise pour diminuer la concentration initiale de 50% ;

mg : Milligramme;

mg EQAG/ mg ext : Milligramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait;

ml : Millilitre;

min : Minutes;

nm : Nanomètre;

PH : Potentiel Hydrogène;

PEN : Prétraitement Enzymatique

R_f : Rapport frontal;

UV : Ultra-Violet;

US : Extraction par Ultrasons

Vis : Visible;

Vit C : Vitamine C;

% : Pourcentage.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition des graines de lin.....	09
Tableau 02 : Formes isomériques des tocophérols.....	11
Tableau 03 : Composition en acides gras de l'huile de <i>Linum usitatissimum</i>	13
Tableau 04 : concentration en lignanes phytoestrogènes.....	25
Tableau 05 : Solvants et réactifs chimiques.....	29
Tableau 06 : Les propriétés organoleptiques et le rendement d'extraction des lignanes de graines de <i>Linum usitatissimum</i>	42
Tableau 07 : Propriétés organoleptiques et le rendement obtenu en lignanes extraits de graines de <i>Sesamum indicum</i>	44
Tableau 08 : Les rapports frontaux Rf des différents CCM d'extrait <i>Linum usitatissimum</i> et du témoin	47
Tableau 09 : Les rapports frontaux Rf des différents CCM d'extrait de <i>Sesamum indicum</i> et du témoin.....	48
Tableau 10 : les teneurs des poly phénols totaux des lignanes	49
Tableau 11 : les teneurs des poly phénols totaux des lignanes.....	50
Tableau 12 : La variation les valeurs d'IC ₅₀ et ARP pour chaque extrait et pour l'antioxydant standard.....	54
Tableau 13 : La variation les valeurs d'IC ₅₀ et ARP pour chaque extrait et pour l'antioxydant standard.....	57
Tableau 14 : Activité antibactérienne des lignanes et zone d'inhibition des souches bactériennes (mm).....	58
Tableau 15 : Activité antifongique de et zone d'inhibition des souches fongiques (mm)	59

Liste des figures

Figure 01 : <i>Linum usitatissimum</i>	04
Figure 02 : Planche botanique de <i>Linum usitatissimum</i>	06
Figure 03 : Evolution du plan de lin du bouton de fleur à la capsule mature.....	07
Figure 04 : La graine de <i>Linum usitatissimum</i>	07
Figure 05 : Gamme de couleurs des graines de lin	08
Figure 06 : Formule chimique des tocophérols (structure R, R, R).....	11
Figure 07 : Structures chimiques du Sécoisolariciresinol DiGlucoside (SDG)	12
Figure 08 : La plante de <i>Sesamum indicum</i>	16
Figure 09 : La graine de <i>Sesamum indicum</i>	17
Figure 10 : Structure des lignanes.....	22
Figure 11 : graines de <i>Linum usitatissimum</i>	28
Figure 12 : graines de <i>Sesamum indicum</i>	28
Figure 13 : graines de <i>Linum usitatissimum</i> broyées et délipidée.....	29
Figure 14 : Graines de <i>Sesamum indicum</i> broyées	34
Figure 15 : Structure de l'acide gallique.....	37
Figure 16 : Réduction du radical DPPH.....	38
Figure 17 : Structure de l'acide ascorbique.....	38
Figure 18 : variation du rendement (%) en lignanes extraits des graines de <i>Linum usitatissimum</i> en fonction des procédés d'extraction.....	42
Figure 19 : Extraits des lignanes des graines de <i>Linum usitatissimum</i> .obtenus par les différents procédés.....	44

Figure 20 : Variation du rendement en lignanes extraits de graines de <i>Sesamum indicum</i> en fonction des procédés d'extraction.....	45
Figure 21 : Extraits des lignanes des graines de <i>Sesamum indicum</i>	46
Figure 22 : Profil chromatographique des lignanes extraits des graines de <i>Linum usitatissimum</i> par les différents procédés.....	46
Figure 23 : Profil chromatographique des lignanes extraits des graines de <i>Sesamum indicum</i> par les différents procédés.....	48
Figure 24 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.....	49
Figure 25 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de vitamine C « Acide Ascorbique ».....	51
Figure 26 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> par macération classique.....	51
Figure 27 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> assisté par ultrasons.....	52
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> sans délipidation assisté par ultrasons	52
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> prétraité enzymatiquement.....	53
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> (enz+ultrasons).....	53
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Linum usitatissimum</i> (ultrasons+enzym).....	54
Figure 32 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de <i>Sesamum indicum</i> classique.....	55

Figure 33 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum*
Assisté par Ultrasons.....56

Figure 34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum*
traité avec l'enzyme.....57

Figure 35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum*
Enz/US.....57

SOMMAIRE

Remerciements.....	
Dédicace.....	
ملخص.....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Introduction.....	1

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la graine de *Linum usitatissimum*

I.1 Historique	03
I.2 Systématique.....	04
I.3 Description botanique de l'espèce <i>Linum usitatissimum</i>	04
a) Description de la plante.....	04
b) Description de la graine.....	07
I.4 Morphologie et microstructure des graines de <i>Linum usitatissimum</i>	08
I.5 Composition chimique.....	09
➤ Protéines.....	09
➤ Composés glucidiques.....	09
➤ Composés antioxydants du <i>Linum usitatissimum</i>	10
1. Les tocophérols.....	10
2. Les polyphénols	11
I.6 L'huile de <i>Linum usitatissimum</i>	13
I.7 USAGES	
❖ Usages culinaires	14
❖ Usages médicinaux.....	14
Chapitre II : Généralités sur la graine de <i>Sesamum indicum</i>	
II.1 Historique	16

II.2	Systématique	16
II.3	Description morphologique	17
II.4	Origine géographique, culture et récolte	18
II.5	Pays producteurs	18
II.6	Composition chimique	18
	• Les lignanes du sésame	19
II.7	USAGES	
	❖ Usages culinaires.....	20
	❖ Usages médicinal	20
CHAPITRE III : Les lignanes		
III.1	Les composés phénoliques.....	21
	• Définition.....	21
	• Structure chimique.....	21
	• Propriétés biologiques des polyphénols	21
III.2	Les lignanes	22
	1. Définition.....	22
	2. Structure des lignanes.....	22
	3. Activités biologiques.....	23
	4. Propriétés antioxydantes	23
III.3	La biosynthèse des lignanes.....	24
	• Biosynthèse du SDG dans les graines de <i>Linum usitatissimum</i>	25
	• Présentation des lignanes de différentes espèces de <i>Linum usitatissimum</i>	25
	• Les graines de <i>Linum usitatissimum</i> , source de lignanes phytoestrogènes.....	25
	• Méthodes d'extraction des lignanes de graines de <i>Linum usitatissimum</i>	26
	• Détermination des conditions d'extraction optimales pour la teneur des lignanes de <i>Sesamum indicum</i>	26
	• Méthodes d'analyses des lignanes.....	27

Partie expérimentale

Chapitre IV Matériels et méthodes

IV.1	Matériel.....	28
IV.1.1	Matière végétale.....	28
IV.2	Extraction des lignanes.....	29

IV.2.1 Graines de <i>linum usitatissimum</i>	29
IV.2.2 Préparation de la matière végétale.....	29
IV.2.3 Extraction par macération.....	30
IV.2.4 Extraction assistée par ultrasons.....	30
Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore.....	30
• Ultrasons de diagnostic	31
• Ultrasons de puissance	31
• Protocole expérimental	31
IV.2.5 Extraction assistée par enzyme	31
➤ Principe.....	31
• Protocole d'extraction.....	32
IV.2.6 Extraction assistée par hydrolyse enzymatique/Ultrasons.....	32
IV.2.7 Extraction assistée par Ultrasons/enzyme	33
IV.3 Extraction des lignanes à partir des graines de <i>Sesamum indicum</i>	33
IV.3.1 Extraction par macération	34
IV.3.2 Extraction assistée par Ultrasons.....	34
IV.3.3 Extraction assistée par l'enzyme.....	34
IV.3.4 Extraction assistée par hydrolyse enzymatique/ ultrasons.....	35
IV.4 Calcul du rendement.....	35
IV.5 Caractérisation qualitative et quantitative des phénols extraits.....	35
IV.5.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM).....	35
➤ Principe.....	35
➤ Mode opératoire.....	36
IV.5.2 Caractérisation quantitative par la méthode de Follin Ciocalteu, dosage des phénols totaux par Colorimétrie.....	36
➤ Principe	36
Acide gallique.....	37
➤ Mode opératoire.....	37
IV.6 Etude de l'activité antioxydante.....	38
IV.6.1 Méthode de réduction du radical libre DPPH.....	38
➤ Principe	38
➤ Acide ascorbique (antioxydant de référence).....	38
➤ Mode opératoire.....	39

IV.6.2 Détermination d'IC ₅₀	39
IV.7 Etude de l'activité antimicrobienne.....	40
✓ Microorganismes utilisés.....	40
✓ Préparation des extraits.....	40
Préparation des disques.....	40
✓ Préparation du milieu de culture.....	40
✓ Préparation de l'inoculum.....	40
✓ Ensemencement et dépôt des disques.....	41
✓ Incubation et Lecture.....	41
✓ Expression des résultats.....	41

Chapitre V Résultats et Discussion

V.1 Extraction des lignanes des graines de <i>Linum usitatissimum</i>	42
V.2 Extraction des lignanes de <i>Sesamum indicum</i>	44
V.3 Caractérisation qualitative et quantitatives des phénols extraits.....	46
V.3.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)	46
V.3.2 Caractérisation quantitative par le dosage calorimétrique de Follin-Ciocalteu.....	48
V.4 Etude de l'activité antioxydante.....	50
V.5 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	50
V.6 Activité antibactérienne.....	58
Conclusion.....	60
Référence.....	61
Annexes.....	66

Introduction

Introduction générale

Durant ces dernières années, une recrudescence d'intérêt a été remarqué concernant les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif impliqué dans le vieillissement et dans le déclenchement et la progression de plusieurs maladies telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires, l'ostéoporose, les maladies inflammatoires...etc

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments.

Les lignanes sont des produits du métabolisme secondaire produit par plusieurs plantes. Chimiquement elles sont des phénylpropane dimères qui présentent en outre des activités biologiques variées. Leurs rôles dans la plante restent à ce jour une énigme. Leurs appartenances aux « métabolites secondaires » (composés n'intervenant pas dans le métabolisme de base) ainsi que les caractéristiques toxiques, antifongiques ou antibactériennes de certains lignanes font émettre l'hypothèse de leurs implications dans les défenses de la plante. Les propriétés antioxydantes pourraient aussi être mises à profit par les végétaux pour protéger des réserves lipidiques d'une peroxydation trop rapide. Les lignanes peuvent avoir des effets bénéfiques pour la santé. Notamment des effets antioxydants. Elles sont donc capables d'inhiber la présence de radicaux libres extrêmement néfastes pour nos cellules.

On trouve les lignanes dans très nombreux végétaux supérieurs, pour peu que leur présence ait été recherchée. En revanche, leur nature, leur localisation et leur teneur sont très variables. Certaines plantes comme le sésame ou le lin en accumulent dans leurs graines [1].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressé à étudier deux espèces : les graines de *Linum usitatissimum* et les graines *Sesamum indicum*, largement utilisées dans l'alimentation et qui présentent une source importante des lignanes ; dans le but d'extraire les lignanes par différents procédés d'extraction à savoir : Extraction par macération hydroalcolique classique ; extraction assistée par Ultrasons, extraction assistée par l'enzyme, extraction assistée par combinaison enzyme/ultrason et extraction assistée par combinaison ultrason/enzyme afin d'étudier l'impact des procédés d'extraction sur le rendement, sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des lignanes des graines *Linum usitatissimum* et les graines *Sesamum indicum*.

Introduction générale

Le présent travail comporte deux parties principales :

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle le premier chapitre présentera des généralités sur l'espèce *Linum usitatissimum*. Par la suite, le second chapitre des généralités sur l'espèce *Sesamum indicum* et le troisième chapitre sera consacré à la présentation des lignanes.
- La seconde partie est une étude expérimentale consacrée à :
 - L'extraction des lignanes par différentes méthodes d'extraction ;
 - La caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait phénolique ;
 - Evaluation de l'activité antioxydante des extraits ;
 - Evaluation de l'activité antimicrobienne.

A partir de l'interprétation des résultats expérimentaux, nous terminerons par une conclusion générale, qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail.

Synthèse

Bibliographique

I.1 Historique

Le lin (*Linum usitatissimum*), plante de la famille des Linacées, fut l'une des premières plantes cultivées par l'Homme. Des traces de son existence datant de - 8000 ans avant J.C. ont ainsi été découvertes dans des cités lacustres suisses. Néanmoins son origine (probablement des hauts plateaux d'Asie) n'est pas connue. Son utilisation a été étendue par l'Égypte des pharaons où les momies étaient entourées de bandelettes de lin. De plus, des fresques retrouvées dans les pyramides illustrent la culture du lin.

La culture du *Linum usitatissimum* a été introduite en Europe par Charlemagne au cours du premier millénaire après J.C. Sa généralisation quant à elle date du XI^{ème} siècle. Il était cultivé principalement en vue de l'utilisation de ses fibres pour la fabrication de textiles (industrie linière). La conquête du nouveau monde a vu son introduction outre atlantique et fut également la cause de son déclin. En effet le développement de la culture du coton en Amériques et l'amélioration des conditions de transport a conduit à la diminution progressive des surfaces cultivées. Au cours des années 1970, la culture a connu un renouveau en France grâce à l'apparition d'aides européennes pour sa culture. Ainsi la surface de lin cultivée en France est passée de 31271 ha en 1972 à 80526 ha en 2004. Au niveau mondial, la production du *Linum usitatissimum* est réalisée principalement au Canada (1^{er} producteur mondial), aux États-Unis et en Chine. Malgré une augmentation importante de la production d'oléagineux en vue de la production d'huile végétale depuis 40 ans, les surfaces de lin cultivées subissent de fortes variations interannuelles mais sans augmentation de la production. En 2006, la production française représente à peu près 1% de la production mondiale de graines oléagineuses et 2% de celle de *Linum usitatissimum* [4].

I.2 Systématique

La classification botanique du *Linum usitatissimum* L est la suivante :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Trcheobiontas*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous- Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Linales*

Famille : *Linaceae*

Genre : *Linum*

Espèce : *Linum usitatissimum* [6].

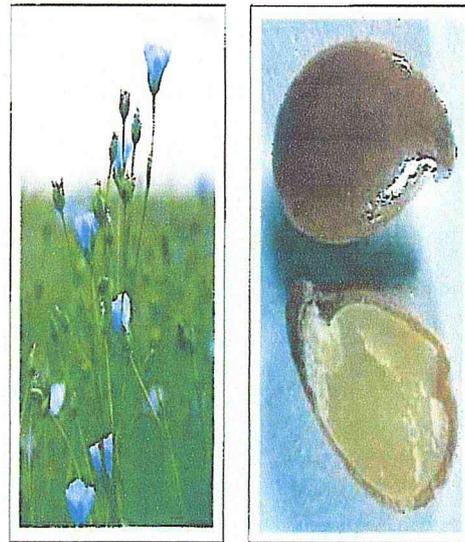


Figure 01 : *Linum usitatissimum* [5].

I.3 Description botanique de l'espèce *Linum usitatissimum*

a) Description de la plante

Le *Linum usitatissimum* est une herbe annuelle dressée à feuilles simples, alternes, lancéolées. Les fleurs pentamères à pétales bleus sont solitaires, portées par des ramifications grêles de la tige. Le fruit est une capsule à dix loges monoséminées.

Cultivé très tôt en Europe pour ses variétés « à fibres », le *Linum usitatissimum* est maintenant largement cultivé pour ses variétés à tiges ramifiées polyflores, plus courtes et moins sensibles à la verse, dites variétés « à graines », au Canada – premier producteur et exportateur du monde-, en Chine, aux Etats-Unis d'Amérique, en Inde, etc. En 2005, la production mondiale de graines s'établissait à 2.7 millions de tonnes. En France, la culture de lin à fibres occupait 76000 ha en 2003, principalement en Haute-Normandie, celle du lin oléagineux environ 5500 ha [7].

Selon la classification botanique de Linné, le lin (*Linum usitatissimum* L.), espèce annuelle herbacée, appartient au sous-embranchement des Angiospermes, et fait partie de l'ordre des Linales, de la famille des Linaceae.

Le *Linum usitatissimum* se présente sous forme de 30 à 80 cm de haut à feuilles alternes, étroites à 3 nervures. Ses fleurs sont regroupées en cymes bipares et leur couleur varie du blanc au violet. La fructification se fait dans des capsules septicides à 5 loges qui peuvent contenir jusqu'à dix graines même si une moyenne de 6 à 8 graines par capsules est normale (Figure 02) [6].

En France, le *Linum usitatissimum* est une plante de printemps, les semis sont réalisés au mois de mars et suit une période végétative de 45 à 60 jours consacrée à la croissance des tiges et des feuilles. Au cours du mois de juin, intervient la floraison qui dure de 15 à 25 jours. Après la fécondation, de 30 à 40 jours de maturation (croissance et dessiccation des graines) sont nécessaires avant de récolter les graines [4].

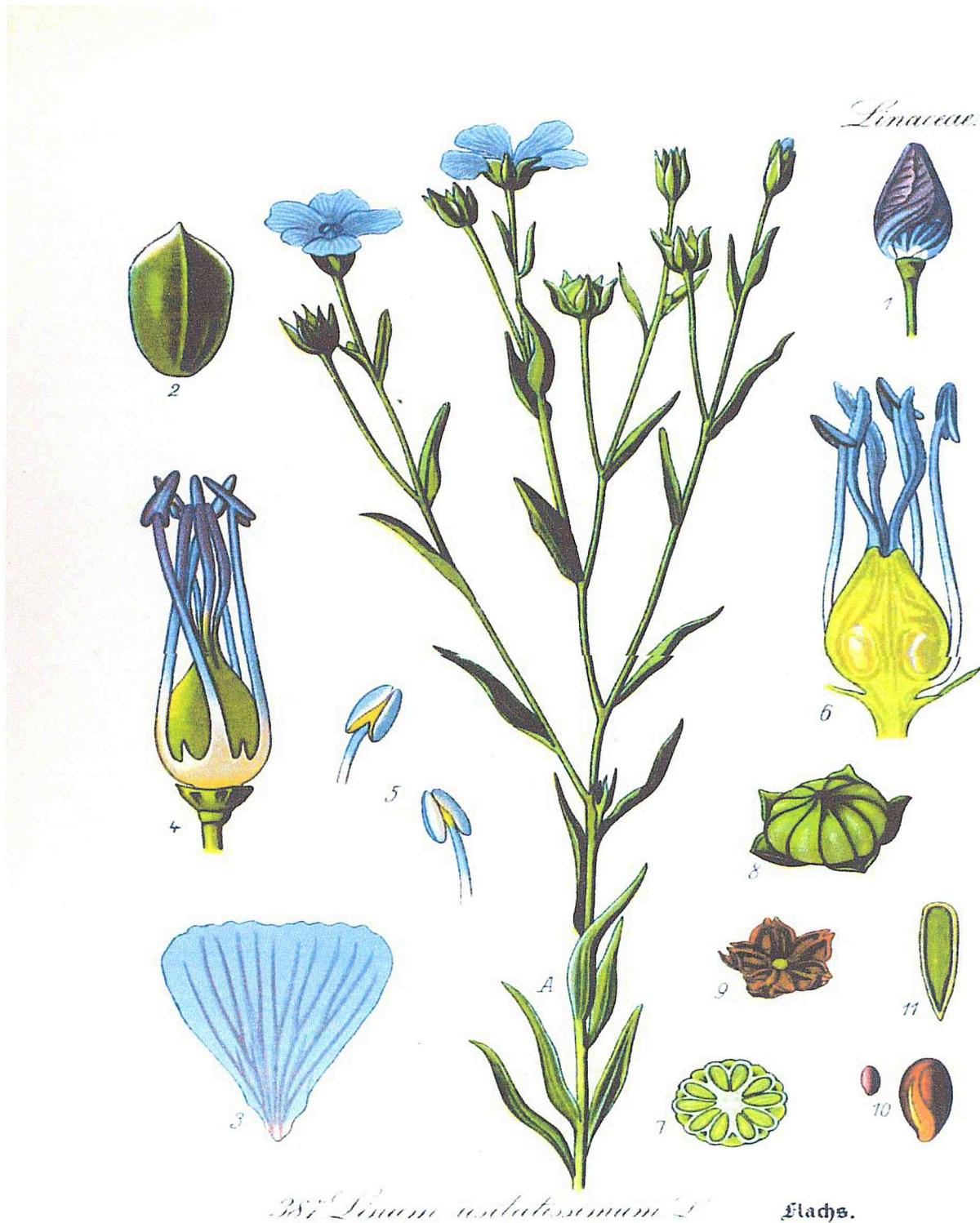


Figure 02 : Planche botanique de *Linum usitatissimum* (A – vue générale de la plante, 1 – implantation des pétales dans le bouton, 2 – sépale, 3 – pétale, 4 – fleur sans sépales ni pétales, 5 – étamines, 6 – coupe longitudinale de 4, 7 – coupe transversale de l’ovaire, 8 – capsule, 9 – capsule ouverte, 10 - graine, 11 – coupe longitudinale de la graine) [4].



Figure 03 : Evolution du plan de lin du bouton de fleur à la capsule mature [4].

b) Description de la graine

La graine de *Linum usitatissimum* est allongée, ovoïde, aplatie ($4-6 \times 2-3 \times 1,5-2$ mm), arrondie à l'une de ses extrémités, pointue à l'autre. Son tégument est brun-rouge foncé ou jaune, lisse et brillant, finement ponctué en surface (loupe). Le hile forme une légère dépression près de l'extrémité en pointe.

Réduire en poudre et observée au microscope (hydrate de chloral), la graine présente des cellules du tégument externe, des cellules collenchymateuses arrondies associées à une assise de cellules scléreuses allongées, des cellules polygonales pigmentées en orange brun, du parenchyme de l'albumen et des cotylédons renfermant grains d'aleurone et gouttelettes d'huile. La graine ne contient pas plus de 10% de graines mates. Son indice de gonflement est supérieur à 4 (ou supérieur à 4,5 dans le cas de la graine pulvérisée) [7].



Figure 04 : La graine de *Linum usitatissimum* [8].

I.4 Morphologie et microstructure des graines de *Linum usitatissimum*

La graine de *Linum usitatissimum* a une forme ovale, aplatie et lisse. La graine présente un bec plus ou moins recourbé à son extrémité. Le tégument de la graine prend des couleurs variant du jaune au marron (figure I-5). Les dimensions des graines commerciales sont variables : de 3,0 à 6,4 mm de longueur, 1,8 à 3,4 mm de largeur et 0,6 à 1,5 mm d'épaisseur en moyenne. Le poids de mille grains varie entre 5 et 10 g [4]. La variabilité de ce poids est relative à la date et à la densité de semis, et rend compte de la bonne formation et alimentation des graines [9].

La graine de *Linum usitatissimum* possède une microstructure caractéristique, chaque tissu ayant une fonction physiologique propre. L'amande est protégée contre les pathogènes et les contraintes mécaniques par le tégument. Celle-ci est composée du spermoderme et de l'épiderme. Différentes assises cellulaires composent le tégument (en partant de l'intérieur vers l'extérieur [10]).

- une couche de pigments, contenant les tanins responsables de la couleur de la graine (du jaune au marron) (endosperme).
- deux assises cellulaires de fibres (longitudinales et transverses) (spermoderme),
- une couche de cellules rondes (spermoderme),
- une assise mucilagineuse, contenant le mucilage est située sur la couche la plus externe de la graine de lin (épiderme).



Figure 05 : Gamme de couleurs des graines de lin [11].

I.5 Composition chimique

La composition de la graine s'établit ainsi : huile (35-45 %), protéines (20-24 %), mucilage (jusqu'à 10 %) ; on note la présence d'hétérosides cyanogènes (linustatine, néolinustatine, traces de linamaroside), de glucosides de lignanes (sécoisolarcirésinol, matairésinol) et de glucosides phénylpropaniques. Le mucilage peut être fractionné en une

fraction neutre, c'est un arabinoxylane ramifié composé de D-xylose, de L-arabinose, de D-glucose et de D-galactose et une fraction acide principalement composée de L-rhamnose et d'acide D-galacturonique [6].

La composition moyenne des graines de lin est donnée dans le Tableau 01.

Tableau 01 : Composition des graines de lin (*pourcentage exprimé par rapport au poids sec, **pourcentage exprimé par rapport à la masse sèche délipidée)

	(Bockisch, 1998)	(Karleskind, 1992b)	(Oomah et Mazza, 1998)	(Oomah et Mazza, 1993)
Huile	34%	35 à 45%*	40,4	35 à 45%
Protéines	23%	36 à 40%**	19,2	10,5 à 31%
Glucides	–	–	8,3	–
Extrait non azoté	24%		–	–
Eau	9%	–	–	–
Fibres	6%	–	–	–
Cendres	4%	–	–	–

Les trois principaux constituants représentent à peu près 80% du poids de la graine néanmoins des composés minoritaires présents dans les graines sont importants lorsque l'on considère les utilisations de ces dernières. Ces composés minoritaires sont le mucilage qui pourrait influencer le procédé d'extraction de l'huile à travers sa capacité à retenir de l'eau, les composés cyanogéniques et les composés phénoliques. Les composés cyanogéniques sont importants car le tourteau obtenu après extraction de l'huile est destiné à l'alimentation animale or ces composés ont un impact négatif sur la valeur nutritionnelle du tourteau.

Enfin, les composés phénoliques doivent également être considérés. En effet, dans le cas du *Linum usitatissimum* (comme du colza), des variétés dites jaunes ont été développées par les sélectionneurs, or ces variétés à la pellicule incolore (d'où leur couleur jaune) présentent des comportements différents de ceux des variétés classiques au cours de la trituration. Les composés phénoliques étant les principaux responsables de la couleur de la pellicule des graines, ils pourraient donc (entre autres) expliquer les différences observées. Les différents constituants des graines vont donc être étudiés selon leur occurrence dans la graine. Seule l'huile sera traitée ultérieurement [4].

➤ Protéines

Le taux de protéines varie entre 10,5 et 31% dans les graines de lin [11].

Ces variations sont tributaires du génotype, cependant les conditions pédoclimatiques ont également un impact sur l'accumulation des protéines. Ainsi, de 2000 à 2001, une variation de 2% de teneur en protéines a été relevée sur la variété n°1 Canadian [12].

Les protéines du *Linum usitatissimum* se répartissent majoritairement dans les cotylédons (76%) et dans l'endosperme (16%) [13].

Les deux principales protéines identifiées sont des protéines de stockage : l'albumine et la globuline. La proportion d'albumine dans la graine varie entre 26 et 41% du total des protéines, cette proportion dépend des variétés de lin [12].

➤ Composés glucidiques

Deux types de composés glucidiques sont identifiés dans la graine mature : l'amidon, présent en faible quantité (de 1 à 2%) et le mucilage (de 3,4 à 9,4%) [14].

Le mucilage est un polysaccharide hétérogène, composé d'oses neutres et acides. Les oses majoritaires identifiés dans le mucilage sont : le D-xylose (19-38%), l'acide D-glucuronique (21-36%), le L-galactose (12-16%) et le L-rhamnose (11-16%). Les oses minoritaires sont le L-arabinose (8-13%), le L-fucose (3,9%) et le D-glucose (4-6%). Cependant la composition du mucilage dépend des variétés de lin et des conditions de culture [15].

➤ Composés antioxydants du *Linum usitatissimum*:

Deux catégories de molécules possédant une activité antioxydante sont présentes dans la graine de *Linum usitatissimum* : les tocophérols et les polyphénols.

1) Les tocophérols

Les tocophérols appartiennent à la classe des vitamines liposolubles. La solubilité dans l'huile des tocophérols est due à la présence d'une chaîne aliphatique à 16 atomes de carbone.

Celle-ci est greffée sur un noyau chromanol qui est à l'origine de l'activité anti-oxydante des tocophérols. Les formes isomériques des tocophérols sont différenciées par la position du groupement méthyl greffé sur le noyau aromatique [16].

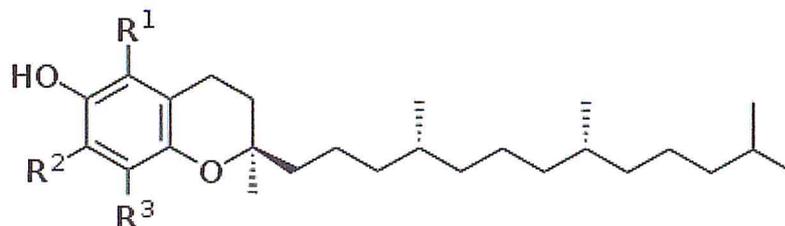


Figure 06 : Formule chimique des tocophérols (structure R, R, R) [16].

Tableau 02 : Formes isomériques des tocophérols [16].

Isomère	R1	R2	R3	mg/100g de graines
Alpha	- CH ₃	- CH ₃	- CH ₃	0,02 – 0,1
Bêta	- CH ₃	- H	- CH ₃	8,45 – 9,72
Gamma	- H	- CH ₃	- CH ₃	
Delta	- H	- H	- CH ₃	0,17 – 0,30

2) Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires spécifiques au règne végétal, et sont caractérisés par la présence d'un cycle benzénique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou liés à un substituant (groupement alkyle, ester ou glucidique). Les lignanes et les acides phénoliques sont les deux catégories de polyphénols identifiés chez le *Linum usitatissimum* [16].

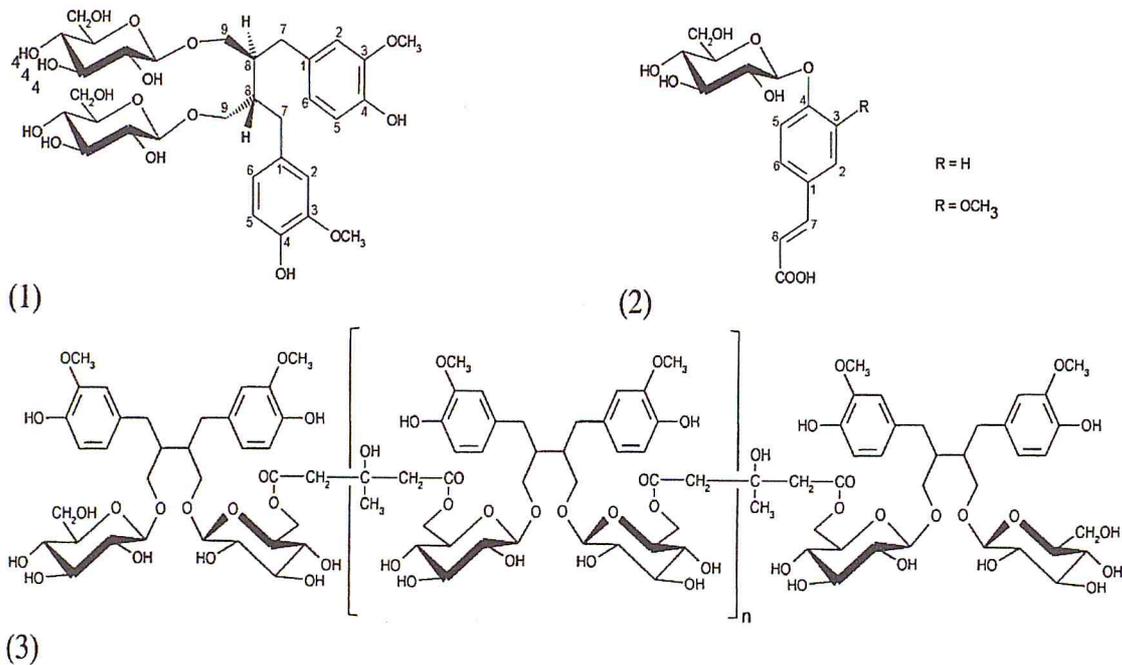


Figure 07 : Structures chimiques du Sécoisolaricresinol DiGlucoside (SDG) (molécule 1), de l'acide glucopyranosyl-p-coumarique ; R=H et de l'acide glucopyranosyl férulique ; R = OCH₃ (molécule 2), et de l'oligomère composé de SDG et d'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique (molécule 3) [17].

Le lignane caractéristique du *Linum usitatissimum* est le Sécoisolaricresinol DiGlucoside (SDG). Il est présent à une concentration de 1 à 1,9 g/100g et est principalement localisé (à 66%) dans la pellicule de la graine. Ces molécules sont présentes sous forme glycosylée polymérisée. Leur quantification dépend donc essentiellement de la méthode d'extraction employée et de l'étape consécutive d'hydrolyse chimique effectuée, alcaline ou acide. Une quantité d'acides phénoliques de 790 à 1030 mg/100g de graines a été rapportée dans la littérature et 48 à 66% de ces acides phénoliques seraient estérifiés (molécules 1 et 2, figure I-7). Les principaux acides phénoliques identifiés dans les graines de *Linum usitatissimum* sont l'acide para-hydroxybenzoïque, l'acide férulique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, et l'acide sinapique.

Le principal intérêt des polyphénols réside dans leur réactivité chimique, due à la présence du cycle benzénique. Les polyphénols exercent leur action antioxydante selon plusieurs mécanismes. D'une part, ils inhibent des enzymes responsables des réactions enzymatiques d'oxydation (par exemple l'oxydo-réductase, la lipoxgénase et la cyclooxygénase). D'autre part, les polyphénols chélatent les ions métalliques permettant de stopper les réactions d'oxydation, les métaux étant des catalyseurs de ces réactions

enzymatiques. Enfin, la capture d'espèces oxygénées réactives de types radicaux libres permet d'interrompre les réactions radicalaires en chaîne [17].

I.6 L'huile de *Linum usitatissimum*

Les graines de *Linum usitatissimum* contiennent de 35 à 45% d'huile, ce qui permet de classer le *Linum usitatissimum* dans la catégorie des oléagineux. Une partie de l'huile se trouve dans la cuticule (10%). Cependant la majorité de l'huile est localisée au niveau des cellules des cotylédons (78%) et de l'endosperme (12%) sous forme de globules lipidiques ou oléosomes (de diamètre moyen 1,3 μ m). Les oléosomes contiennent des lipides neutres (triglycérides, de 96 à 98%), des lipides polaires (phospholipides et glycolipides, de 1 à 1,6%) et des oléosines₆ (1,3%) [8]. répartition des acides gras de l'huile de lin est précisée tableau 03.

Tableau 03 : Composition en acides gras de l'huile de *Linum usitatissimum* [14].

Nom commun de l'acide gras	Nomenclature biochimique	Répartition (%)
Acide palmitique	C16:0	4 – 6
Acide stéarique	C18:0	2 – 3
Acide oléique	C18:1 ω 9	10 – 22
Acide linoléique	C18:2 ω 6	12 – 18
Acide α - linoléique	C18:3 ω 3	50 – 62

Comme l'illustre la classification des graines de *Linum usitatissimum* parmi les graines oléagineuses, elles sont principalement formées de lipides (huile), de glucides (polysaccharides) et de protéines. La pellicule de la graine représente 41,4% de la masse de la graine mais ne contient que 1,84% de l'huile. Ainsi, 96,7% de l'huile est contenue dans l'embryon [18].

I.7 USAGES

❖ Usages culinaires

Les graines de *Linum usitatissimum* grillées servaient autrefois à préparer une boisson de couleur sombre – une sorte de «café du pauvre».

Les graines de lin sont un important fournisseur d'acide linoléique (oméga-3), qui est utilisé entre autres pour remplacer les œufs dans certains produits de régime et aliments.

La présence d'hétérosides cyanogènes n'interdit pas la consommation des graines. Si celles-ci ne constituent pas un aliment, elles peuvent, sous réserve que leur teneur ne dépasse pas 5 %, être incorporées dans les pains spéciaux et les crackers. Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France a en effet estimé que, dans ces conditions, elles ne présentaient pas d'effets néfastes sur la santé

L'incorporation de graines ou autres produits du lin à la ration alimentaire des animaux permet d'obtenir des produits alimentaires (œufs, viandes, poissons) enrichis en acides gras polyinsaturés de la série oméga-3 [7].

❖ Usage médicinal

Cette plante, utilisée depuis les temps les plus reculés, connaît actuellement une véritable renaissance. Elle est employée en usage interne, à cause de ses fibres qui stimulent l'activité intestinale, en cas de constipation chronique, de gastrite – maux fréquents dus à une mauvaise alimentation dans notre «Civilisation moderne». Les graines mises à tremper, soit entières, soit broyées, dans suffisamment de liquide peuvent apporter un soulagement rapide et durable. Mais le *Linum usitatissimum* est également efficace en cas de pharyngite, de troubles bronchiques chroniques, de toux et de maux de gorge.

En usage externe, cette espèce est utilisée – sous forme de cataplasme de graines de *Linum usitatissimum* que l'on a fait tremper – contre les brûlures, les abcès, les inflammations et les furoncles.

L'huile de *Linum usitatissimum* reste également toujours très importante pour la fabrication industrielle de laques, peintures et produits d'imprégnation du bois naturels.

Les fibres courtes du *Linum usitatissimum* sont employées dans la fabrication du papier; ses graines permettent également de fabriquer un fixateur pour cheveux naturel.

Les graines en poudre, mélangées au miel, sont employées contre la toux, l'asthme, les inflammations des voies urinaires et comme apéritif. L'infusion des graines constitue un bon remède contre la constipation. Un abus de l'huile peut être à l'origine d'intenses diarrhées [19]. .

En France, la Note explicative de l'Agence du médicament (1998) admet qu'il est possible de revendiquer, pour la graine de lin, l'indication thérapeutique suivante (voie orale) : « traitement symptomatique de la constipation ». Aucune évaluation toxicologique n'est demandée pour la constitution d'un dossier « abrégé » d'AMM (poudre, graine pour tisane, extrait aqueux et extrait hydro-alcooliques de titre faible).

En Allemagne, la monographie établie par la Commission E du *BFArM* précise que la graine de lin est utilisée en cas de constipation chronique, de colon irrité par un abus de laxatif ou de colon irritable, de diverticulite et, comme mucilage, en cas de gastrite ou d'entérite [7].

II.1 Historique :

Le sésame (*Sesamum indicum*) est une plante oléagineuse, appartenant à la famille des Pédaliacées. Cultivée depuis près de 5000 ans, on pense que le sésame est originaire d'Afrique, et qu'il s'est répandu ensuite aux Indes, en Chine et au Japon dans les temples les plus anciens. Le sésame jouait un rôle important dans les cérémonies et était utilisé par les Babyloniens pour la préparation de médicaments aux plantes et de vin. En Inde, il est symbole de l'immortalité.

Les graines de *Sesamum indicum* sont de formes ovales, petites et plates d'1 mm d'épaisseur. Les graines ne sont pas de couleur uniforme. Les graines grillées peuvent varier du blanc cassé au gris foncé en passant par l'orange clair et la couleur miel.

Le sésame (*Sesamum indicum*) est une plante de la famille des Pédaliacées, largement cultivée pour ses graines. Les graines de *Sesamum indicum* sont considérées comme une des premières graines oléagineuses jamais cultivées. Elles étaient consommées en Inde il y a plus de 7 500 ans et en Chine il y a 5 000 ans [20].

II.2 Systématique

La classification botanique du *Sesamum indicum* est la suivante :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Trcheobiontas*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Pedaliaceae*

Genre : *Sesamum*

Espèce : *Sesamum indicum* [2].

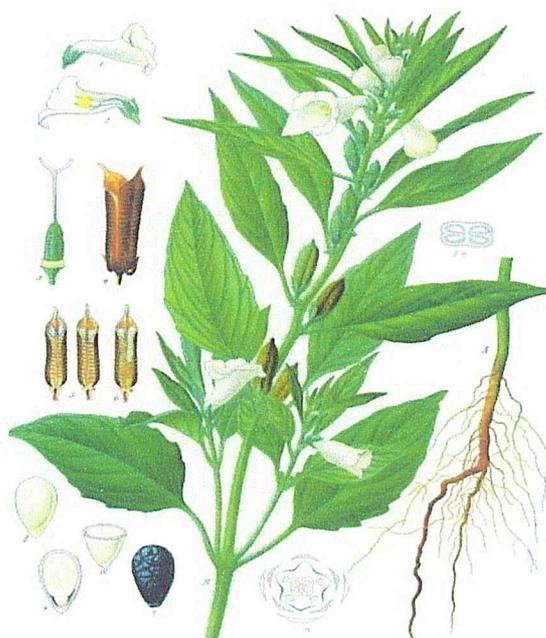


Figure 08 : La plante de *Sesamum indicum* [2].

II.3 Description morphologique

Le *Sesamum indicum* est une herbe annuelle pouvant atteindre 60 cm à 1 m, portant des feuilles oblongues à lancéolées, les feuilles inférieurs étant lobées. Les fleurs axillaires, isolées, ont une corolle bilabée, rose pâle ou blanche, 4 étamines didynames (2 grandes et 2 petites), un ovaire biloculaire. Par suite de la formation d'une fausse cloison, le fruit mûr est une capsule oblongue à 4 loges contenant chacune 15 à 20 graines.

Les graines de *Sesamum indicum*, sont ovales aplaties, de forme et de dimensions proches de celles du Lin, à tégument lisse, mat ; suivant les variétés celui-ci est blanc ou noir, parfois brun rougeâtre. Elles mesurent 2-3 mm de long sur 1.5 de large et 0.5 mm d'épaisseur.

Ces graines n'ont pas d'odeur, leur saveur est douce et oléagineuse [7].



Figure 09 : La graine de *Sesamum indicum*

II.4 Origine géographique, culture et récolte

Le *Sesamum indicum* est un des végétaux les plus anciennement cultivés.

On ignore s'il est originaire de l'Inde ou de l'Est africain. Il est aujourd'hui cultivé dans de nombreuses régions tropicales, subtropicales ou tempérées chaudes : Chine, Inde, Pakistan, Proche-Orient, Europe méridionale (Grèce), Afrique tropicale, Amérique latine.

C'est une plante rustique, peu exigeante, à cycle végétatif très bref : 3 à 5 mois. Les capsules de la plante type s'ouvrent spontanément à maturité en laissant échapper les graines; il existe des variétés à capsules indéhiscentes. On récolte les graines à maturité [7].

II.5 Pays producteurs

Les plus importants sont asiatiques : Chine (600 à 800.000 t), Inde (400.000 t), Pakistan, Proche-Orient. Mais une quantité appréciable de Sésame est produite aussi en Afrique (Egypte, Soudan, etc.) et en Amérique latine. La production annuelle est voisine de 2 million de t [7].

II.6 Composition chimique

La graine de *Sesamum indicum* renferme environ 5 % de matières minérales, 20% de glucides (amidon et oligosaccharides : plantéose, lychnose , sésamose), 20-25 % de protides. Sa teneur en lipides est élevée : 40 à 50%.

L'huile de *Sesamum indicum* renferme 10 à 15 % de glycérides d'acides saturés : palmitique, stéarique, arachidique. Mais elle est surtout constituée par des glycérides d'acides insaturés : oléique et linoléique. Malgré cette richesse en dérivés non saturés, cette huile est remarquable par sa stabilité, due à la présence, dans l'insaponifiable, de composés jouant un rôle antioxydant.

Cet insaponifiable renferme : un phytostérol ; un phénol, le sésamol (hydroxy-méthylène-dioxybenzène). Des composés du groupe des lignanes : sésamine % et sésamoline. Ces substances ont été anciennement isolées à l'état cristallisé, mais leur structure n'a été élucidée que par Haworth et Haslam (1955). Ce sont des dérivés du diphenylpropane portant des groupements méthylène-dioxy. (Le groupe méthylènedioxy est constituée de deux atomes d'oxygène reliés à un pont méthylène (-CH₂- unitaire). Le groupe méthylènedioxy trouve généralement attaché à une structure aromatique telle que phényle, où il forme la

méthylènedioxyphényle ou benzodioxole groupe fonctionnel qui est largement présent dans les produits naturels).

Le sésamole est responsable de certaines réactions colorées, dont la plus connue est celle de Baudouin : l'huile, agitée avec de l'acide chlorhydrique concentré renfermant un peu de saccharose, prend une coloration rose puis rouge. On peut remplacer le saccharose par le furfural, ce sucre auquel il donne naissance sous l'action de l'acide chlorhydrique concentré. Cette réaction est utilisée comme réaction d'identité de l'huile de *Sesamum indicum* et pour sa caractérisation dans les graisses alimentaires.

On a enfin caractérisé dans le Sésame de petites quantités des vitamines A et E.

L'huile extraite par les solvants a des utilisations industrielles : savonnerie, cosmétologie [4].

- **Les lignanes du *Sesamum indicum***

La graine de *Sesamum indicum* est l'un des aliments qui contient le plus des lignanes, des composés végétaux jouant un rôle semblable à celui de l'œstrogène; c'est pourquoi on les appelle aussi phytoestrogènes. Les lignanes sont considérées comme offrant un large éventail d'effets bénéfiques pour la santé. Le sésame et ses lignanes stimulent les niveaux d'antioxydants, diminuent l'inflammation, normalisent la pression sanguine et améliorent le profil lipidique. Ils agissent de façon synergique avec d'autres nutriments, comme le gamma-tocophérol, les huiles de poisson ou l'acide linoléique conjugué, augmentant leur biodisponibilité et leur efficacité [21].

La sésamine est l'une des principales lignanes du *Sesamum indicum* : chaque gramme de graine en contient environ 2,24 mg [22]. En plus de posséder des propriétés antioxydantes [23], les lignanes du sésame pourraient avoir d'autres bienfaits. Chez des personnes hypercholestérolémiques, la consommation de sésamine semble diminuer le cholestérol total et LDL [25].

La consommation d'aliments riches en lignanes est présumée avoir des effets positifs sur la santé humaine. Comme de nombreux aliments sont consommés principalement sous forme transformée, il est important d'étudier les modifications de la teneur en lignanes pendant le traitement. A cet effet, les graines de sésame et non chauffées, les produits chauffés de sésame.

II.7 USAGES

❖ Usages culinaires

La graine de *Sesamum indicum* a une grande valeur alimentaire. Ses protides renferment les amino-acides indispensables, en particulier une quantité assez importante de méthionine (La méthionine est un acide α -aminé dont l'énantiomère L, elle est encodée sur les ARN messagers par le codon AUG, et joue un rôle particulier dans la biosynthèse des protéines)

Elle est consommée telle quelle ou sous forme de farine dans les pays tropicaux où la plante est cultivée. Elle rentre dans la préparation de diverses pâtisseries orientales.

L'huile, extraite par expression, est également alimentaire dans ses pays d'origine. Ailleurs, on l'utilise en mélange avec d'autres graisses dans diverses margarines et assaisonnements.

Au Moyen-Orient, les graines de *Sesamum indicum* décortiquées sont principalement utilisées dans la production de « tahina » (pâte de graines de sésame), produit huileux de consistance pâteuse, obtenu par broyage des graines décortiquées et torréfiées soit à la vapeur soit à des températures plus élevées [26].

❖ Usages médicinal

En pharmacie, l'huile de *Sesamum indicum* est un laxatif doux et un solvant médicamenteux au même titre que l'huile d'Olive, mais plus stable.

L'huile de *Sesamum indicum* est largement employée dans la cuisine asiatique. Au Japon, en Chine et en Corée, on lui attribue des propriétés médicinales. En Occident, l'huile de sésame sert surtout à la fabrication de margarines, de savons, de produits cosmétiques [26].

III.1 Les composés phénoliques

- **Définition**

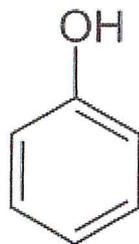
Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière [28].

.

- **Structure chimique**

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relie [28].



Molécule phénol

- **Propriétés biologiques des polyphénols**

Les recherches récentes sur les composés phénoliques sont très poussées, en raison de leurs divers propriétés physiologiques, comme les activités anti-allergique, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardio-protective et vasodilatatoire.

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire [29].

III.2 Les lignanes

1. Définition

Le terme lignane a été introduit par Haworth (1936) pour décrire un groupe de dimères de phénylpropanoïdes dont les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) du groupement propane de leur chaîne latérale. Les phénylpropanoïdes (C6C3) doivent leur nom à leur structure dérivée de la phénylalanine : un noyau aromatique (C6) avec une chaîne propane (C3). En 1969, McCredie et al, proposent d'étendre le terme afin d'inclure tous les composés naturels de faible poids moléculaire dérivant du couplage oxydatif d'unités hydroxyphénylpropènes, puis Gottlieb, en 1972, introduit le terme néolignane pour décrire des composés de deux phénylpropanes liés autrement que par une liaison 8-8'. Ces deux définitions des lignanes de Haworth (1936) et des néo-lignanes de Gottlieb (1972) ont été adoptées par les recommandations IUPAC. Cependant la publication de ces recommandations IUPAC étant récente, il arrive de trouver des appellations « propres à certains auteurs » dans de nombreuses publications [30].

Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal. La distribution botanique des lignanes est large: plusieurs centaines des composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les gymnospermes, ils sont surtout rencontrés dans les bois alors que chez les Angiospermes, ils ont été identifiés dans tous les tissus, ils ont été découverts dans toutes les parties des plantes : les racines, les feuilles, les fruits et les graines [31].

2. Structure des lignanes

Les lignanes sont répartis en huit groupes structuraux (Pinorésinol, Podophyllotoxine, Laricirésinol, Déhydropodophyllotoxine, Sécoisolaricirésinol, Gimisine, Matairésinol, Lactol) classés selon le mode d'incorporation du (ou des) atome (s) d'oxygène dans le squelette carboné et selon le type de cyclisation [32].

3. Activités biologiques

Selon [4], les lignanes présentent plusieurs activités biologiques telles que les activités antivirales, anticancéreuses, antimicrobiennes et antioxydantes [4].

4. Propriétés antioxydantes

- Le sécoisolaricirésinol ainsi que l'entérodiol et l'entérolactone (les entérolignanes qui en dérivent) possèdent des propriétés antioxydantes, le SDG est capable de piéger les formes radicalaires de l'oxygène.

Le sécoisolaricirésinol sous sa forme di-glucoside a lui aussi des propriétés antioxydantes, comparables à celle de la vitamine E, mais il est moins antioxydant que sa forme déglucosylée.

De plus, l'hinokinine, également présente bien qu'en moindre quantité chez le lin a aussi été recensée comme possédant des propriétés antioxydantes [33].

- **Les lignanes phytoestrogènes**

Il a été montré que l'alimentation occidentale favorise davantage l'apparition de cancer du sein, du côlon et de la prostate que l'alimentation des populations orientales.

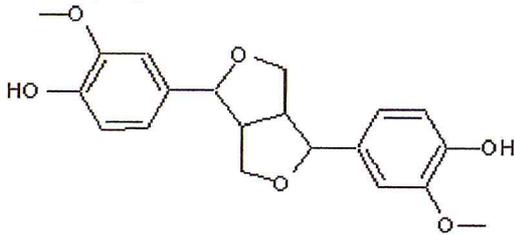
Cette différence de risque vis-à-vis du cancer est attribuée à deux classes de composés phénoliques contenus dans la plante : les lignanes et les isoflavones.

Bien qu'il existe des milliers de lignanes différents, seuls quelques-uns sont actuellement crédités d'un rôle préventif et protecteur vis-à-vis de certains cancers, notamment les cancers hormono-dépendants.

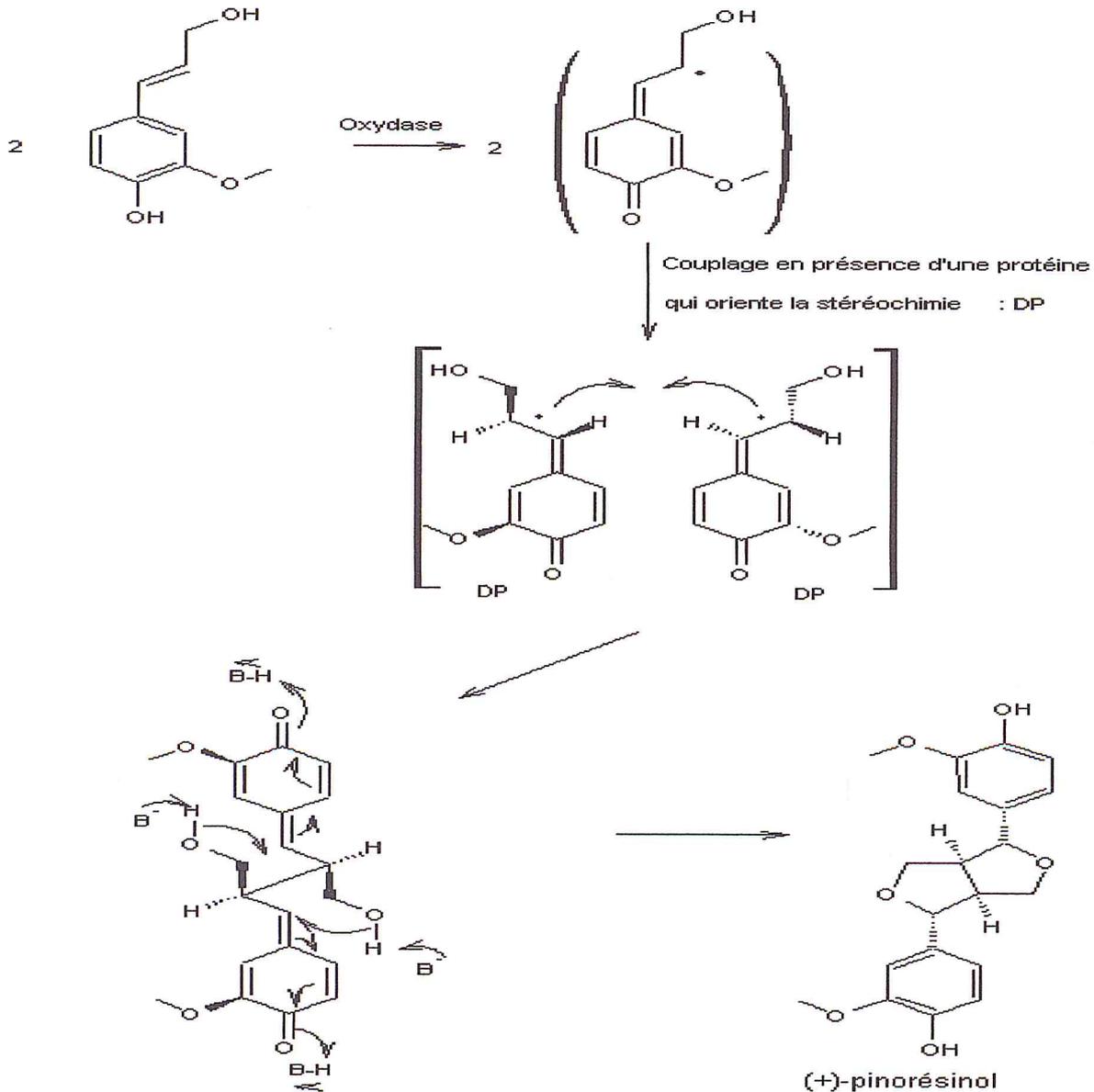
Il a été constaté qu'une administration du lignane phytoestrogène SDG par voie orale avait des effets d'inhibition des premiers stades de cancérogenèse chez le rat. L'ingestion de SDG purifié à des doses de 1,5 mg / jour pendant vingt semaines, débutant une semaine après traitement par un agent cancérigène (le diméthylbenzanthracène), réduit de manière significative (de 37 à 46 %) le nombre de tumeurs chez le rat Les lignanes phytoestrogènes constituent donc des molécules intéressantes pour la santé humaine [34].

III.3 La biosynthèse des lignanes

Prenons comme exemple le pinorésinol (C₂₀H₂₂O₆) qui dérive de deux molécules d'alcool coniférylique :



Sa biosynthèse peut se résumer ainsi :



La protéine qui oriente la stéréochimie, appelée protéine directrice (Dirigent Protein en anglais ou DP) est une autre protéine que l'enzyme qui catalyse la réaction. En son absence, il

se forme également, après création des radicaux, du (-)-pinorésinol, de l'alcool (±)déhydroconiférylique et des éthers alcools en quantité comparable à celle du (+)-pinorésinol, alors qu'en sa présence ces composés se forment en très petite quantité [35].

- **Biosynthèse du SDG dans les graines de *Linum usitatissimum***

La voie de biosynthèse des lignanes chez le lin (*L. usitatissimum*) débute probablement par le couplage oxydatif 8-8' de l'alcool E-coniférylique formant le (-)-pinorésinol via un complexemultienzymatique DP-laccase. Le (-)-pinorésinol est ensuite converti en (-)-sécolaricirésinol puis (+)-sécoisolaricirésinol sous l'action d'une PLR. Puis, le (+)-sécoisolaricirésinol est glycosylé par la sécoisolaricirésinol diglucosyltransférase en SDG. Enfin, le SDG est mono- et di-estérifié avec du HMG-CoA avant d'être polymérisé en complexe SDG-HMG.

Il est intéressant de noter que dans les graines de lin, deux diastéréoisomères de SDG sont présents ; la forme dominante est le (+)-sécoisolaricirésinol (ca 99 %), mais une quantité minime de l'autre antipode (ca 1 %) a également été mise en évidence (Ford et al, 2001), alors que le couplage de l'alcool coniférylique par le complexe DP/laccase engendre seulement du (-)-pinorésinol (Ford et al, 2001). Il est à noter aussi que le gène *LuPLR2* codant l'enzyme responsable de la biosynthèse du (-)-sécoisolaricirésinol s'exprime dans la graine.

- **Présentation des lignanes de différentes espèces de *Linum usitatissimum***

L'arbre phylogénétique des différentes espèces de *Linum usitatissimum* a été établi par [34] et montre que les linacées constituent un groupe monophylétique. Plus récemment, ont pu préciser le contenu en lignanes des parties aériennes de chaque espèce et le corrélérer à la phylogénie des différentes espèces de lin [36].

- **Les graines de *Linum usitatissimum*, source de lignanes phytoestrogènes**

Les graines de lin (*Linum usitatissimum*) constituent la principale source alimentaire de précurseurs d'entérolignanes. En effet le principal lignane des graines de lin est le sécoisolaricirésinol sous sa forme conjuguée diglucosylée (SDG), il est accumulé à des taux qui sont de 75 à 800 fois plus importants que ceux mesurés dans d'autres sources alimentaires de ce lignane [34].

Tableau 04 : concentration en lignanes phytoestrogènes (en µg pour 100 g de matière fraîche) dans les principales plantes cultivées accumulatrices.

Graines	Sécoisolaricirésinol	Matairésinol
<i>Lin</i>	165759	529
<i>Blé (son)</i>	868	410
<i>Seigle (son)</i>	462	729
<i>Sarrasin</i>	350	39
<i>Noix de cajou</i>	316	55
<i>Sésame</i>	240	1137
<i>Amande</i>	159	24

- **Méthodes d'extraction des lignanes de graines de *Linum usitatissimum***

Les approches d'extraction de lignanes développées sur la graine sont aussi applicables à d'autres tissus et potentiellement à d'autres espèces, mais la graine de *Linum usitatissimum* étant l'organe de la plante le plus riche en lignanes, une attention toute particulière a été portée à l'extraction à partir de la graine. Le principal lignane rencontré dans la graine de *Linum usitatissimum* cultivé est le sécoisolaricirésinol, qui est stocké sous forme di-glucoside et complexé. La structure et les éléments du complexe sont connus; ce complexe contient :

- Acide coumarique
- Acide férulique
- Herbacétine glucosylée
- Acide 3-hydroxy-3- methylglutarique
- Sécoisolaricirésinol diglucoside.

Le méthanol est le solvant le plus indiqué pour l'extraction de lignanes à partir de graines puisqu'il permet la solubilisation des lignanes mais n'extrait pas les lipides aussi très présents dans la graine (Slanina et al, 2004). À la suite d'une extraction méthanolique, une hydrolyse basique est nécessaire afin de couper la liaison ester qui maintient le SDG dans le complexe [37].

- **Détermination des conditions d'extraction optimales pour la teneur des lignanes de *Sesamum indicum***

Les lignanes de graines de *Sesamum indicum* jouent un rôle important dans les propriétés bénéfiques pour la santé. En outre, la nourriture les chercheurs ont mis l'accent sur de nouveaux effets pharmacologiques concernant lignanes pour améliorer la valeur nutritionnelle et fonctionnelle de sésame.

Toutefois, l'évaluation du contenu des lignanes de *Sesamum indicum* grâce à diverses méthodes d'extraction n'a pas été étudiée en détail [38].

- **Méthodes d'analyses des lignanes**

Dans la présente étude, seuls les lignanes végétaux seront considérés. L'analyse des lignanes a pour objectif de détecter et de quantifier (lorsque cela est possible) les lignanes contenus dans une plante. La séparation des différentes molécules d'un extrait de plante étant un pré-requis indispensable à la détection des molécules étudiées, l'utilisation de techniques séparatives est considérée comme faisant partie intégrante de l'analyse des lignanes.

Différentes techniques ont été développées pour l'analyse quantitative des lignanes, d'autres sont plus particulièrement adaptées à l'analyse qualitative. Les méthodes les plus communément utilisées sont la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), et moins fréquemment, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Une méthode de chromatographie électrocinétique micellaire (MEC) pour l'analyse des lignanes a également été mise au point, mais cette méthode est peu utilisée.

Les lignanes détectés sont identifiés par comparaison avec un standard, par spectrométrie de masse ou par RMN [39].

Partie Expérimentale

Ce chapitre est consacré à :

- Extraction des lignanes à partir des graines de *Linum usitatissimum* et *Sesamum indicum* par différents procédés d'extractions ;
- Analyses qualitative et quantitative des polyphénols ;
- Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH des lignanes ;
- Evaluation l'activité antimicrobienne des lignanes.

IV.1 Matériel

IV.1.1 Matière végétale

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est constitué de deux espèces de *Linum usitatissimum* et *Sesamum indicum*. Ces graines d'origine Indienne ont été achetées dans un magasin se trouvant à Blida.



Figure 11 : graines de *Linum usitatissimum*

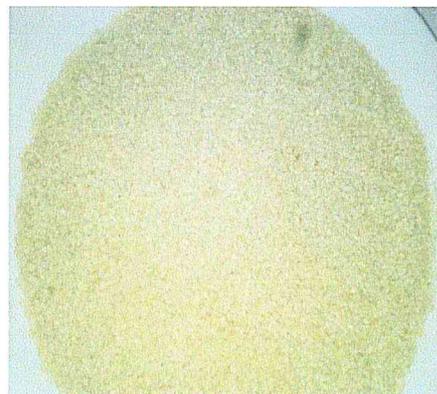


Figure 12 : graines de *Sesamum indicum*

IV.1.2 Tableau 05 : Solvants et réactifs chimiques

Produits	Marque
Ethanol	Sigma aldrich (Allemagne)
Méthanol	/
n-Hexane	/
Acide citrique	/
Acide ascorbique	Panreac Quimica (Espagne)
Acide gallique	Sigma aldrich (Allemagne)
HCl	Sigma aldrich (Allemagne)
NaOH	Sigma aldrich (Allemagne)
DPPH	Alfa Aesar (Allemagne)
Enzyme Cellulase	Sigma aldrich (Allemagne)
Folin Ciocalteu	/
Na ₂ CO ₃	/
DMSO	/

IV.2 Extraction des lignanes

IV.2.1 Graines de *Linum usitatissimum*

IV.2.2 Préparation de la matière végétale

Les graines de lin sont broyées dans un moulin à café pour obtenir une poudre fine. La matière broyée est macérée dans l'hexane (1: 6, p / v) pendant 12 h à température ambiante. La matière végétale délipidée est séchée à l'air pendant 12h et stockée dans un récipient fermé pour une utilisation ultérieure.



Figure 13 : graines de *Linum usitatissimum* broyées et délipidée

IV.2.3 Extraction par macération

40 g de la matière végétale délipidée est macérée dans 480 ml de solvant éthanol/eau (7:3 V/V), à température de 40°C pendant 28h. L'extrait hydro alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide de papier filtre puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Heidolph à une température de 50°C, jusqu'à l'obtention d'un sirop jaune clair. Ensuite, on effectue une hydrolyse basique sur le sirop, utilisant une solution 1M de NaOH pendant 12h à température ambiante.

Le sirop hydrolysé est acidifié avec HCl 0.5M jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 6. Le sirop est refroidi à 15 °C, ensuite centrifugé à une vitesse de 2.000 tours pendant 10 mn pour précipiter et éliminer les polysaccharides et les protéines solubles dans l'eau ensuite évaporer le surnageant pour obtenir un résidu sec [39].

IV.2.4 Extraction assistée par ultrasons

Les techniques conventionnelles d'extraction ou d'isolation de composés chimiques de matrices végétales présentent souvent des contraintes telles que celles des faibles rendements, des temps d'extraction très longs et d'utilisation des grandes quantités de solvants. Ces dernières années de nombreuses techniques alternatives ayant pour but de pallier à ces problèmes se sont développées. Parmi elles, émergent les micro-ondes, les fluides supercritiques et les ultrasons. Les contraintes écologiques et l'émergence de la sécurité alimentaire et industrielle, incitent les professionnels à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes. Toutes visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement.

Les ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés industriels. En effet, la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide [40].

- **Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore**

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences:

- **Ultrasons de diagnostic**

Ces ultrasons sont aussi appelés ultrasons de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10 MHz). Les ultrasons constituent une méthode non destructive d'évaluation de propriétés physico-chimiques ou mécaniques, de mesures de concentrations, de mesures de niveaux, etc. Les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle car leur utilisation est simple, efficace et autorise une visualisation en temps réels des organes comme le cœur sans effet ionisant ni destructif.

- **Ultrasons de puissance**

Aussi appelés ultrasons de haute intensité ou de basse fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération des réactions chimiques en milieu hétérogène ou l'extraction d'arômes. Contrairement aux ultrasons de diagnostic, ces ultrasons sont capables de générer des bulles de cavitation [41].

- **Protocole expérimental**

Les graines de *Linum usitatissimum* broyées délipidées et non délipidées sont utilisées pour l'extraction des lignanes par ultrasons [42]. 40 g de matière végétale délipidées et non délipidées sont mélangées avec 480 ml de solvant hydro alcoolique éthanol/eau 70% (v/v) dans un bécher, placé dans un bain à ultrasons de type Falc de fréquence 40 KHz pendant 1h à une température 30 °C. Le mélange obtenu est filtré à l'aide de papier filtre puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Heidolph à température de 50° C jusqu'à obtenir un sirop jaune clair.

On réalise une hydrolyse basique sur le sirop en utilisant une solution 1M de NaOH pendant 12h à température ambiante. Le sirop hydrolysé est acidifié avec HCl 0.5M jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 6. Le sirop est refroidi à 15 °C, ensuite centrifugé à une vitesse de 2.000 tours pendant 10 mn pour précipiter et éliminer les polysaccharides et les protéines solubles dans l'eau ensuite évaporer le surnageant pour obtenir un résidu sec.

IV.2.5 Extraction assistée par enzyme

- **Principe**

L'application réussie des enzymes pour l'extraction d'une variété des produits, y compris l'extraction des caroténoïdes de la peau de tomates, de la vanilline à partir des gousses de vanille verte, l'huile extraite à partir des pépins de raisins, des polysaccharides de *sterculia* et les polyphénols, indique que les enzymes peuvent également être utiles pour l'extraction des composés bioactifs à partir d'autres sources végétales. Les enzymes sont utilisées en particulier pour le traitement de la matière végétale avant des procédés d'extraction classique. La connaissance préalable de la composition de la paroi cellulaire de la matière première permet dans la sélection d'une enzyme ou d'enzymes utile pour le prétraitement. Pour cela diverses enzymes telles que la cellulase, l'hémicellulase, β -glucosidase, ect... sont souvent nécessaires pour rompre l'intégrité de la structure de la paroi cellulaire de la plante, ce qui améliore l'extraction de composés bioactifs à partir de plantes. Ces enzymes, hydrolysent les composants de la paroi cellulaire, ce qui accroît la perméabilité de la paroi cellulaire qui se traduit par des meilleurs rendements d'extraction de composés bioactifs. La réaction des enzymes est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires. Les études récentes sur l'extraction assistée par l'enzyme ont montré une extraction plus rapide et offre une économie en énergie une fois comparée aux méthodes non enzymatiques, elle a un impact environnemental moindre. Les extractions à base d'enzymes font l'objet de la recherche continue et ont le potentiel d'être commercialement intéressantes [43].

- **Protocole d'extraction**

On prépare une suspension enzymatique (enzyme Cellulase avec l'eau) à une concentration de 0,4%. On ajoute de l'acide citrique à 0,1% pour maintenir le pH à 4. La suspension est uniformément pulvérisée sur 40g de matière végétale délipidée. Le mélange obtenu est incubé à une température de 45°C pendant 2h à température 50°C.

La matière traitée avec l'enzyme est macérée dans 480 ml de solvant éthanol/eau (7:3 V/V), à température de 40°C pendant 6 h. l'extrait hydro alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide de papier filtre puis concentré avec un évaporateur rotatif de type Heidolph à température de 50° C jusqu'à l'obtention d'un sirop jaune clair. Par la suite, une hydrolyse basique est effectuée sur le sirop, en utilisant 1M de NaOH pendant 12h à température ambiante.

Le sirop hydrolysé est acidifié avec HCl 0.5M à pH 6, refroidie à 15 °C, ensuite centrifugé à une vitesse de 2.000 tours pendant 10 mn pour précipiter et éliminer les polysaccharides et les protéines solubles dans l'eau ensuite évaporer le surnageant pour obtenir un résidu sec.

IV.2.6 Extraction assistée par hydrolyse enzymatique/Ultrasons

On prépare une suspension enzymatique (l'enzyme Cellulase avec l'eau) à une concentration de 0,4%. On ajoute de l'acide citrique à 0,1% pour maintenir le pH à 4. La suspension est uniformément pulvérisée sur 40g de matière végétale délipidée. Le mélange obtenu est incubé pendant 2h à température 50°C.

La matière traitée avec l'hydrolyse enzymatique est macérée dans 480 ml de solvant éthanol/eau (7:3 V/V), dans un bain ultrasons de type Falc de fréquence 40 KHz pendant 1 h à une température 30 °C. Le mélange obtenus est filtré à l'aide de papier filtre puis concentré avec un évaporateur rotatif de type Heidolph à température de 50° C et permettant d'obtenir un sirop jaune clair.

Par la suite, On réalise une hydrolyse basique sur le sirop en utilisant une solution 1M de NaOH pendant 12h à température ambiante.

Le sirop hydrolysé est acidifié avec HCl 0.5M jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 6 . Le sirop est refroidi à 15 °C, ensuite centrifugé à une vitesse de 2.000 tours pendant 10 mn pour précipiter et éliminer les polysaccharides et les protéines solubles dans l'eau ensuite évaporer le surnageant pour obtenir un résidu sec.

IV.2.7 Extraction assistée par Ultrasons/enzyme

40 g de matière végétale délipidée est mélangée avec 480 ml de solvant hydro alcoolique éthanol/eau 70% (v/v) dans un bécher, dans un bain ultrasons de type Falc de fréquence 40 KHz pendant 1h à une température de 30 °C.

Après on ajoute la suspension enzymatique à une concentration de 0.4% et pH à 4 (avec l'ajout de l'acide citrique à 0,1%). Le mélange obtenu est incubé pendant 2h à température 50°C.

Le mélange obtenu est filtré à l'aide de papier filtre puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Heidolph à température 50° C jusqu'à obtenir un sirop jaune clair. Ensuite, une hydrolyse basique sur le sirop est effectuée en utilisant une solution 1M de NaOH pendant 12h à température ambiante. Le sirop hydrolysé est acidifié avec HCl 0.5M jusqu'à obtenir un pH égale à 6. Le sirop est refroidi à 15 °C, ensuite centrifugé à une vitesse de 2.000 tours pendant 10 mn pour précipiter et éliminer les polysaccharides et les protéines solubles dans l'eau ensuite évaporer le surnageant pour obtenir un residu sec.

en agitant le mélange, ensuite on rajoute de l'acide citrique pour maintenir le pH à 4. Le mélange ainsi obtenu est incubé pendant 2h à température 50°C.

La matière prétraitée avec l'enzyme est macérée dans 250 ml de solvant éthanol/eau 80% (V/V), à température ambiante pendant 24h, est l'extraction a été répétée 2 fois. L'extrait hydro alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide de papier filtre. Le mélange éthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation sous vide dans avec un évaporateur rotatif de type Heidolph à température de 50° C et permettant ainsi d'obtenir un résidu sec.

IV.3.4 Extraction assistée par hydrolyse enzymatique/ ultrasons

On prépare une suspension enzymatique composée de l'enzyme cellulase et l'eau (concentration de l'enzyme égale à 0,4%). Cette suspension est versée dans un bécher tout en agitant le mélange, ensuite on rajoute de l'acide citrique pour maintenir le pH à 4. Le mélange ainsi obtenu est incubé pendant 2h à température 50°C.

La matière prétraitée avec la cellulase est macérée dans 250 ml de solvant éthanol/eau 80% (V/V), dans un bain à ultrasons de type Falc de fréquence 40 KHz pendant 1h à une température de 30°C. Le mélange obtenu est filtré à l'aide de papier filtre puis concentré avec un évaporateur rotatif de type Heidolph à température de 50° C permettant d'obtenir un résidu sec.

IV.4 Calcul du rendement

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

$$R = M/M_0 \times 100$$

M : la masse de l'extrait sec

M₀ : la mass de la matière végétale

IV.5 Caractérisation qualitative et quantitative des phénols extraits

IV.5.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

➤ Principe

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile [46].

➤ Mode opératoire

Les échantillons sont analysés en utilisant des plaques CCM commerciales prêtes à être utilisées, de gel de silice de dimension (20/20cm).

Après avoir déposés les échantillons sur des points repères à environ 1cm du bord inférieur de la plaque, les dépôts sont séchés et la plaque est introduite dans une cuve de migration dans l'enceinte est préalablement saturé. La révélation des composés séparés se fait par la méthode d'iode, les tâches sont ensuite cerclées au crayon.

Le système du solvant « éluant » ont été essayé est :

- ✓ Chloroforme /Méthanol /Eau (24/32/1) (v/v/v) ;

Calcul du rapport frontal (R_f) est donné par la relation suivante :

$$R_f = D_c / D_s$$

Où : D_c : la distance parcourue par le composé (mesurer au centre de la tâche) ;

D_s : la distance parcourue par le front du solvant.

IV.5.2 Caractérisation quantitative par la méthode de Follin Ciocalteu, dosage des phénols totaux par Colorimétrie

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de folin–Ciocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible. Une coloration bleue se produit,

possédant une absorption maximum aux environ de 750-760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques oxydés [45].

Le tracé de la droite d'étalonnage de ce dosage (absorbance en fonction des concentrations connues à partir d'une gamme étudiée); permet de déterminer graphiquement la concentration puis la teneur des composés phénoliques dans nos extraits.

Acide gallique :

➤ Sources :

L'acide gallique est largement distribué dans diverses plantes, fruits et aliments, ou il est présent sous forme libre ou, plus communément, comme ingrédient de tanins, à savoir les gallotannins. Les noix de galle, citrons, thé vert, raisins, fraises sont connus pour être riches en AG.

➤ Structure

L'AG ou acide 3, 4, 5-trihydroxy-benzoïque ($C_6H_2(OH)_3 COOH$) issu de la voie de l'acide shikimique est un membre de la classe des acides hydroxy-benzoïques [45].

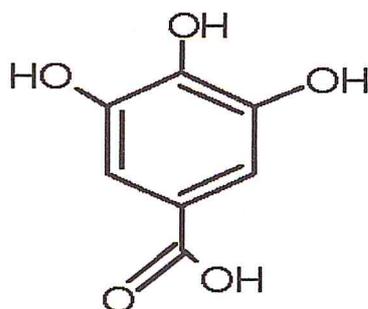


Figure N°15: Structure de l'acide gallique

➤ Mode opératoire

20 mg des extraits des graines de *Linum usitatissimum* et *Sesamum indicum* a été dissout dans 10ml de mélange de solvant éthanol/eau 50% (v/v). 0.5 ml de ces solutions ont été mélangées avec 5ml d'eau distillée et 0.5ml de réactif de Follin Ciocalteu puis 0.5ml de la solution saturée de Na_2CO_3 (10%) a été ajouté au mélange. Après incubation du mélange réactionnel pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 750 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, le domaine choisi est de (0- 0.06 mg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du

dosage. Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent d'acide gallique par 1mg poids sec des extraits (μg EAG/mg d'extrait).

IV.6 Etude de l'activité antioxydante

IV.6.1 Méthode de réduction du radical libre DPPH

➤ Principe

Pour évaluer l'activité antiradicalaire, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par Sanchez *et al.*, (1998). Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence des composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Le DPPH réagit avec un antioxydant par arrachement d'un hydrogène, il se forme alors le 2,2-diphénylhydrazine DPPH2 [49].

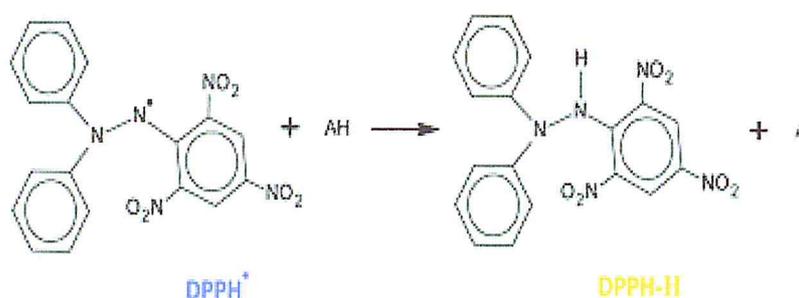


Figure 16 : Réduction du radical DPPH.

➤ Acide ascorbique (antioxydant de référence)

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble considéré comme le plus efficace des antioxydants présents dans le sang [50].



Figure 17 : Structure de l'acide ascorbique

➤ **Mode opératoire**

La méthode décrite par Tepe et al. (2005) a été employée. Différentes concentrations comprises entre 0-50 mg/ml des échantillons étudiés (les différents extraits) et des témoins (acide ascorbique « l'antioxydant de référence »). Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, 50 ml de solution échantillons et témoins sont ajoutées à 2 ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 mn en obscurité à la température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant [51].

Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur).

Un volume de 2 ml de différentes concentrations de chaque extrait ainsi exprimées en mg/ml (0.02, 0.06, 0.08, 0.14, 0.2, 0.3, 0.4) ajoutées à 2ml de la solution méthanolique du DPPH (0.04mg/ml) fraîchement préparée. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 mn. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 517nm.

Le blanc est représenté par un mélange de solvant méthanol/eau (50/50%) (v/v) puisque nous avons réalisé la dilution de notre gamme par ce mélange, le témoin négatif est composé de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH et 2 ml de solvant, le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: l'acide ascorbique (vitamine C),

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire (Radical Scavenger Activity) ou pourcentage d'inhibition (I%) est estimée selon l'équation suivante :

$$I\% = (\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle négatif}) \times 100$$

IV.6.2 Détermination d'IC₅₀

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testée nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par la méthode de régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées [52].

IV.7 Etude de l'activité antimicrobienne

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des extraits des lignanes par la méthode de diffusion sur gélose. En utilisant des souches de référence bactérienne et des champignons connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogènes pour l'homme et l'animal [53].

✓ Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude sont référencées ATCC (American Type Culture Collection). Elles ont été choisies pour leurs contaminations élevées et leurs pathogénicités.

Les tests sont réalisés sur quatre bactéries (*Escherichia coli* (Gram⁻), *Salmonella typhi* (Gram⁻), *Staphylococcus aureus* (Gram⁺), *Bacillus subtilis* (Gram⁺)) et trois champignons (*Candida albicans*, *Saccharomyces* et *Aspergillus niger*). Ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10ml de l'eau physiologique. Les tests antimicrobiens sont réalisés au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida.

✓ Préparation des extraits

Les différents extraits ont été dissous dans Diméthyl sulfoxide ou DMSO. Les dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations au 200mg/ml.

Préparation des disques

Les disques sont stérilisés à l'autoclave et conservés jusqu'à l'utilisation.

✓ Préparation du milieu de culture

Les géloses de Muller Hinton et de Saboureaud stériles prêtes à l'usage ont été coulées dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

✓ Préparation de l'inoculum

- Dans la zone septique du bec bunsen, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes et levure à tester.
- Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MC Farland.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

✓ **Ensemencement et dépôt des disques**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.

-Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

-Des disques servant des témoins chargés du méthanol ont été utilisé pour chaque souche

✓ **Incubation et Lecture**

Après incubation 18-24 heures à 37°C dans l'étuve pour les bactéries 24-72 heures à 28°C pour les levures, Les résultats sont observés, en mesurant les diamètres d'inhibition.

✓ **Expression des résultats**

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminée par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm
- Peu sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm
- Sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm

V. Résultats et Discussions

V.1 Extraction des lignanes des graines de *Linum usitatissimum*

Les propriétés organoleptiques et le rendement d'extraction des lignanes des graines de *Linum usitatissimum* obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont présentés dans le tableau 06 :

Tableau 06 : Les propriétés organoleptiques et le rendement d'extraction des lignanes de graines de *Linum usitatissimum*.

Extrait	Aspect	Couleur	Odeur	Rendement %
Classique	Semi solide	Marron foncée	Caractéristique	5.2
Avec délipidation assisté par US	/	Marron foncée	/	8.91
Sans délipidation assisté par US	/	Marron	/	4.5
PEN	/	Marron	/	15.75
EN-US	/	Marron	/	13.11
US-EN	/	Marron	/	5.64

Le graphe suivant présente la variation du rendement en fonction des procédés d'extraction :

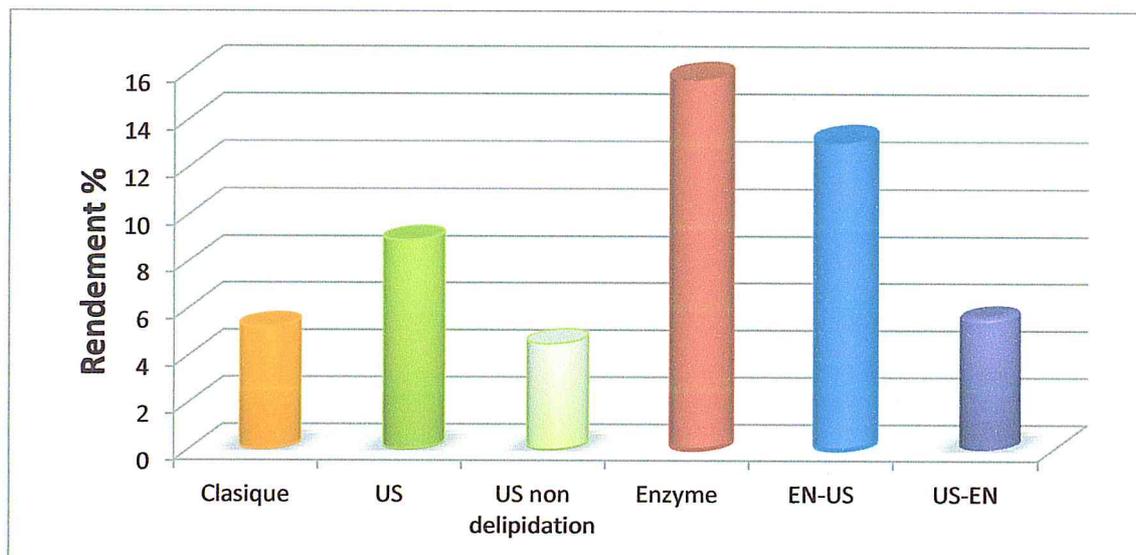


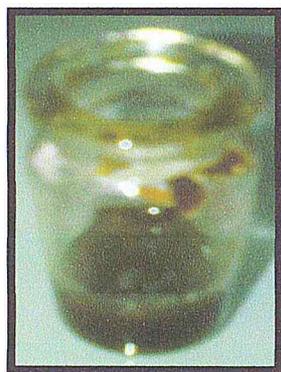
Figure 18 : variation du rendement (%) des extraits riche en lignanes des graines de *Linum usitatissimum* en fonction des procédés d'extraction

D'après ces résultats, on constate que le rendement des lignanes varie en fonction du procédé d'extraction. Le prétraitement enzymatique des graines de *Linum usitatissimum* a donné le meilleur rendement, de l'ordre de 15.75%, suivi par hydrolyse enzymatique-ultrason (13.11%). L'utilisation du prétraitement enzymatique des graines avant l'extraction a permis d'augmenter le rendement d'extraction des lignanes. Ce prétraitement vise à rompre les parois des cellules renfermant le produit à extraire.

Ce prétraitement a pour effet :

- de réduire la consommation d'énergie (temps de macération du mélange hydroalcoolique avec prétraitement enzymatique était égale à 6H, alors qu'une macération hydroalcoolique sans prétraitement était égale à 28h).
- Augmenter le rendement d'extraction en passant de 5,2% en macération hydroalcoolique classique sans prétraitement à 15,75% avec prétraitement enzymatique.

Quant à l'extraction assistée par les ondes ultrasons, on remarque d'une part, que le rendement obtenu avec la matière délipidée est plus important que la matière non délipidée, ce qui peut signifier que la délipidation favorise l'extraction des lignanes. D'autre part, en comparant le rendement d'extraction de la macération hydroalcoolique classique était 5,2% inférieur au rendement de l'extraction assistée par l'ultrason avec délipidation (8,91%). La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes, puisque l'effet mécanique des ultrasons sur la matière végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction et la cinétique d'extraction. En effet la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide.



Ext classique



Ext avec délipidation
assisté par US



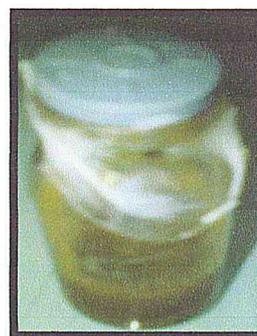
Ext sans délipidation
assisté par US



Ext PEN



Ext US-EN



Ext PEN-US

Figure 19 : Extraits riche en lignanes des graines de *Linum usitatissimum*. obtenus par les différents procédés

V.2 Extraction des lignanes de *Sesamum indicum*

Les propriétés organoleptiques et le rendement d'extraction des lignanes des graines de *Sesamum indicum* obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont présentés dans le tableau 07 :

Tableau 07 : Propriétés organoleptiques et le rendement obtenu en lignanes extraits de graines de *Sesamum indicum*

Extraits	Aspect	Couleur	Odeur	Rendement %
Macération classique	Semi solide	Jaune	Caractéristique	0.4
US	/	/	/	0.8
PEN	/	/	/	1.1
EN-US	/	/	/	1.98

La figure suivante présente la variation du rendement en fonction des procédés d'extraction :

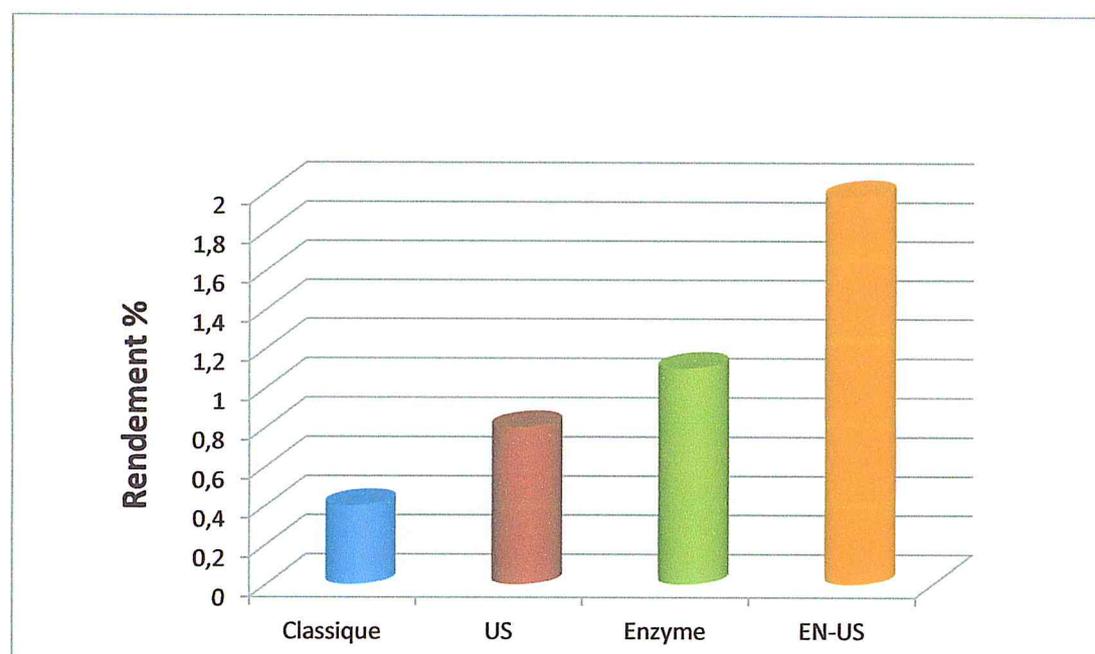


Figure 20 : Variation du rendement des extraits riche en lignanes de graines de *Sesamum indicum* en fonction des procédés d'extraction

D'après les résultats obtenus, on observe que le meilleur rendement d'extraction des lignanes est obtenu avec la méthode de combinaison du prétraitement enzymatique/ultrason (1,98%) suivi par la méthode de prétraitement enzymatique (1,1%). ce rendement est supérieur à l'extraction assistée par ultrason (0,8%) et à l'extraction par macération classique (0,4%)

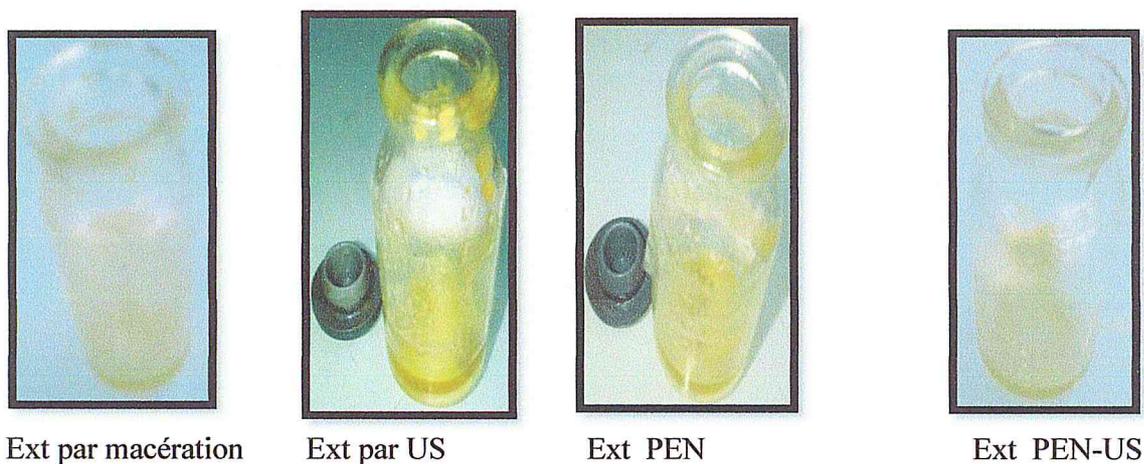


Figure 21 : Extraits riche en lignanes des graines de *Sesamum indicum*.

V.3 Caractérisation qualitative et quantitatives des phénols extraits

V.3.1 Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

- Les lignanes des graines de *Linum usitatissimum*

Après le développement dans une cuve en verre, la lecture a été faite par la méthode de révélation d'iode et les rapports frontaux des spots ont été calculés. Le profil chromatographique de l'extrait phénolique est représenté dans la figure suivante :

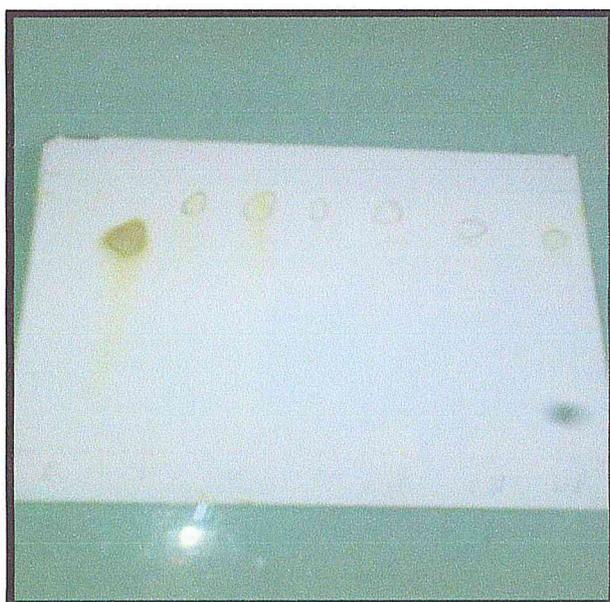


Figure 22 : Profil chromatographique des extraits riche en lignanes des graines de *Linum usitatissimum* par les différents procédés.

Il apparaît clairement sur ce chromatogramme que les lignanes extraits sont riches en polyphénols, montrant un nombre de spots avec des positions et d'intensité différentes. Les rapports frontaux des spots issus de la séparation de l'extrait et même du témoin « acide gallique » sont donnés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Les rapports frontaux Rf des différents CCM d'extrait *Linum usitatissimum* et du témoin.

Extraits	Rf	Etalon « Acide gallique »
par macération classique	0.9	0.75
Avec délipidation assisté par Ultrasons	0.91	0.75
sans délipidation assisté par Ultrasons	0.89	0.75
PEN	0.89	0.75
PEN-US	0.86	0.75
US-EN	0.81	0.75

- **Les lignanes des graines de *Sesamum indicum***

Après le développement dans une cuve en verre, la lecture a été faite par la méthode de révélation d'iode et les rapports frontaux des spots ont été calculés. Le profil chromatographique de l'extrait phénolique est représenté dans la figure suivante :

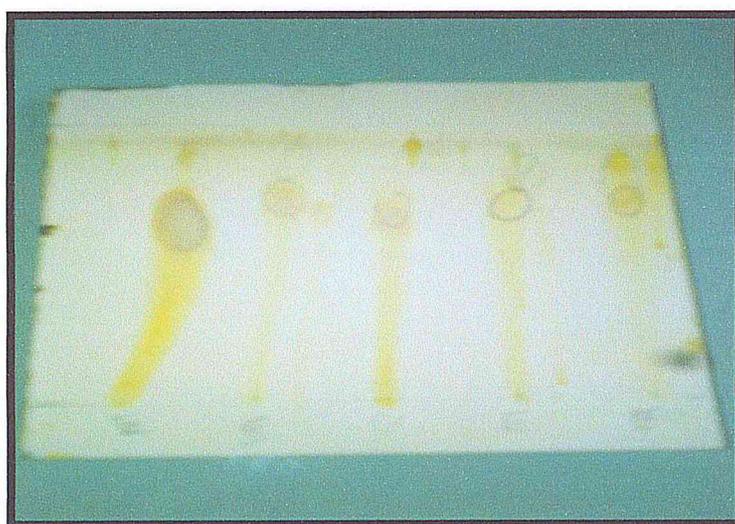


Figure 23 : Profil chromatographique des extraits riche en lignanes des graines de *Sesamum indicum* par les différents procédés

Il apparait clairement, sur ce chromatogramme que les lignanes extraits sont riches en polyphénols, montrant un nombre de spots avec des positions et d'intensité différentes. Les rapports frontaux des spots issus de la séparation de l'extrait et même du témoin « acide gallique » sont donnés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Les rapports frontaux Rf des différents CCM d'extrait de *Sesamum indicum* et du témoin

Extraits	Rf	Etalon « Acide gallique »
macération classique	0.7	0.67
US	0.68	0.67
PEN	0.68	0.67
EN-US	0.7	0.67

V.3.2 Caractérisation quantitative par le dosage calorimétrique de Follin-Ciocalteu

La quantité des composés phénoliques a été déterminée par la méthode de Follin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 750nm. Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux présentes dans l'échantillon.

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les composés phénoliques pour les raisons suivantes ; c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Follin et la méthode est bien standardisée, la longueur d'onde (750nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde.

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée en prenant l'absorbance en fonction de chaque concentration (mg/ml).

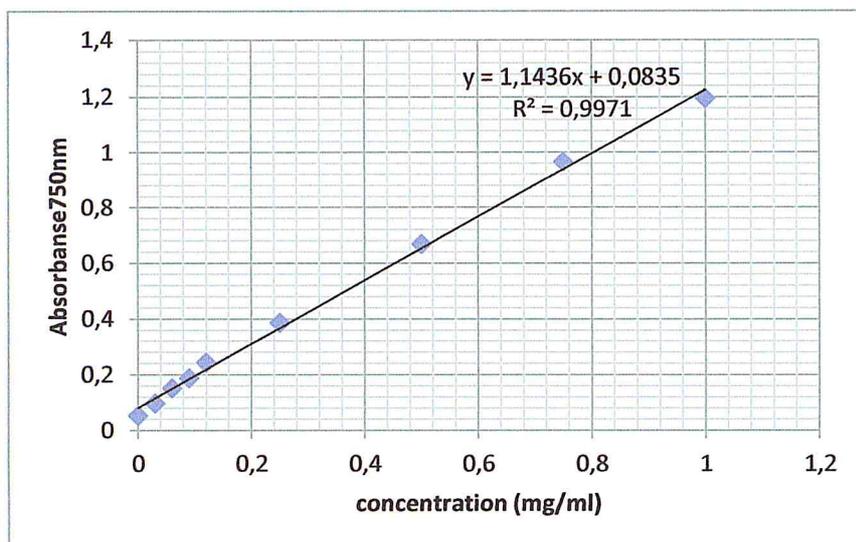


Figure 24 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($y = 1.1436x + 0,0835$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait)

Les tableaux suivants enregistrent les absorbances de l'acide gallique à chaque concentration (mg.ml).

- Graines de *Linum usitatissimum*

Tableau 10 : les teneurs des poly phénols totaux des lignanes

Extraits	Teneur (mgEAG/g)
Classique	1.86 ± 0.06
Avec délipidation assisté par US	2.7975 ± 0.09
Sans délipidation assisté par US	1.59 ± 0.06
PEN	1.9825 ± 0.07
EN-US	2.2825 ± 0.08
US-EN	2.405 ± 0.08

Les résultats du dosage des Polyphénols totaux révèlent que :

La teneur en composés phénoliques de l'extrait ultrasonique (2.7975 ± 0.09 mgEAG/g d'extrait) est supérieure à celle de l'extrait ultrasons/enzyme (2.405 ± 0.08 mgEAG/g d'extrait), l'extrait enzyme ultrasons renferme (2.2825 ± 0.08 mgEAG/g d'extrait), tandis que l'extrait sans délipidation ultrasons ne contient que (1.59 ± 0.06 mg EAG/g d'extrait).

- Graines de *Sesamum indicum*

Tableau 11 : les teneurs des poly phénols totaux des lignanes

Extrait	Teneur (mgEAG/g)
Classique	1.2175 ± 0.04
Ultrasons	1.7 ± 0.06
Prétraitement enzymatique	1.435 ± 0.05
Enzyme+ultrasons	1.085 ± 0.03

L'extrait ultrasonique est plus riche en composés phénoliques (1.7 ± 0.06 mgEAG/g d'extrait) suivi par l'extrait avec prétraitement enzymatique (1.435 ± 0.05 mg EAG/g d'extrait), alors que l'extrait obtenu par macération classique renferme (1.2175 ± 0.04 mg EAG/g d'extrait) et l'extrait enzyme/ultrasons ne contient que (1.085 ± 0.03 mg EAG/g d'extrait) respectivement.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que les extraits de graines de *Linum usitatissimum* sont les plus riches en phénols totaux par rapport aux extraits des graines de *Sesamum indicum*. En effet, la teneur en polyphénols totaux se diffère d'une plante à une autre même entre les espèces du même genre, Ceci pourrait être aux techniques d'extraction et aussi bien à d'autres facteurs environnementaux tels que le climat, l'exposition au soleil et la composition du sol, qui peut changer le métabolisme phénolique des plantes.

V.4 Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

- Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune pâle mesurable à 517 nm (photographie représentatif de ce changement de couleur est dans l'annexe 3). Le virage vers cette coloration et l'intensité de

cette coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire.

La valeur d'IC₅₀ représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. Afin de déterminer cette valeur pour chaque extrait, les courbes de la variation du pouvoir d'inhibition I% en fonction de la concentration sont établies dans les tableaux dans l'annexe 4 et représentés dans les figures suivantes :

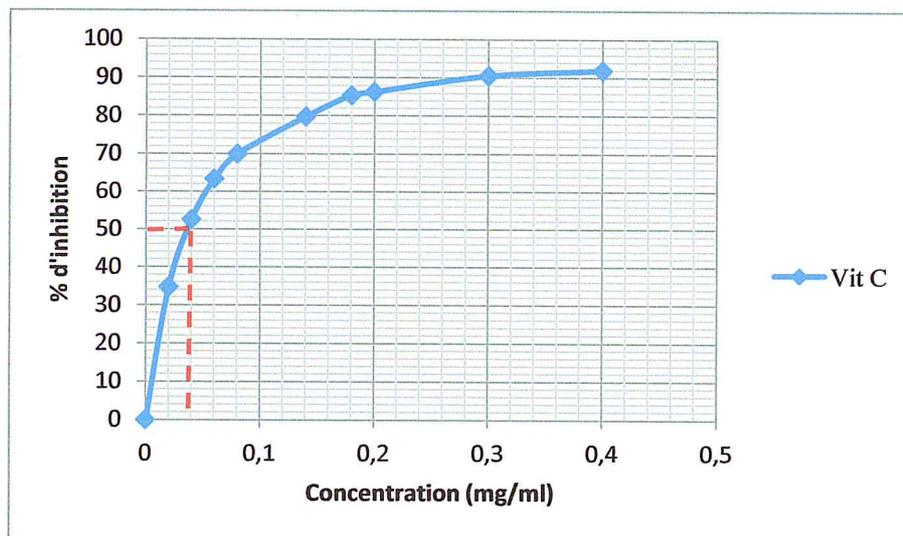


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de vitamine C « Acide Ascorbique ».

- Graines de *Linum usitatissimum*

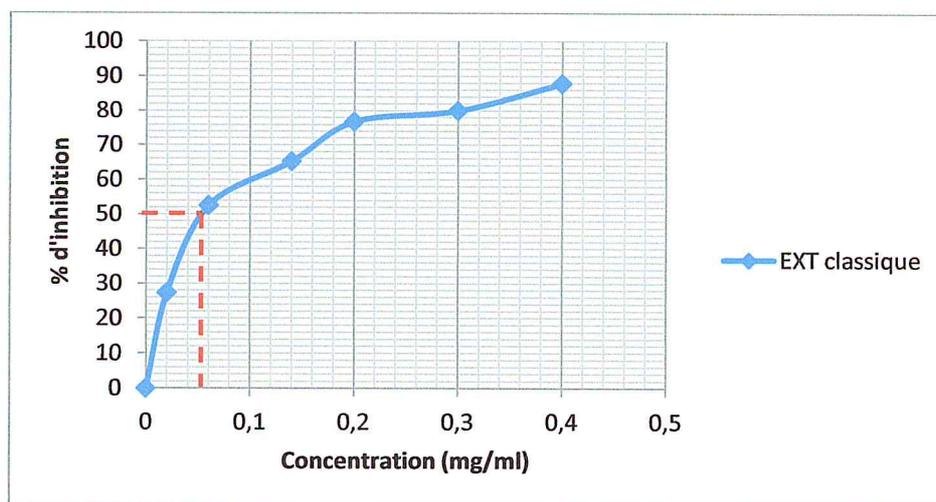


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Linum usitatissimum* par macération classique.

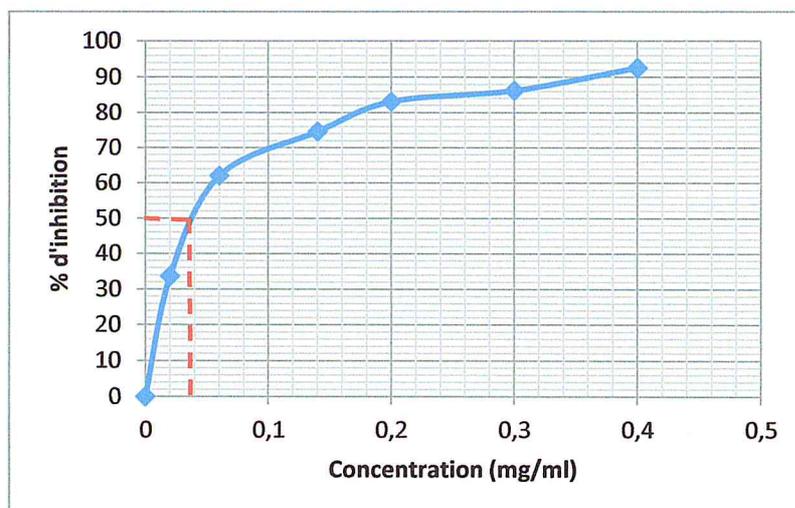


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Linum usitatissimum* assisté par ultrasons

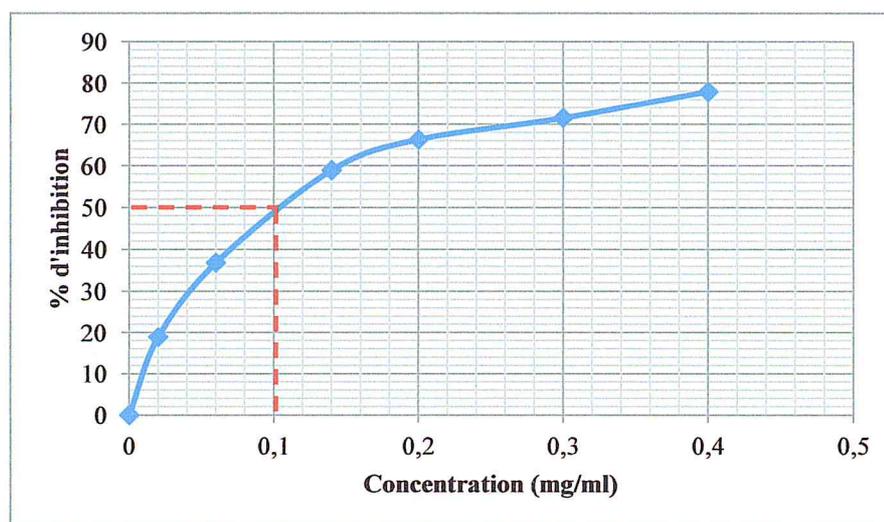


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Linum usitatissimum* sans délipidation assisté par ultrasons

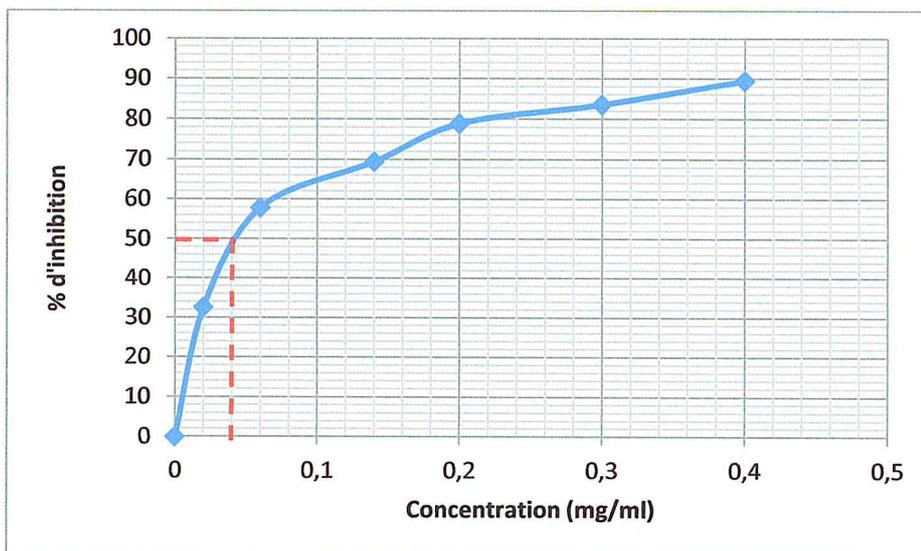


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Linum usitatissimum* prétraité enzymatiquement

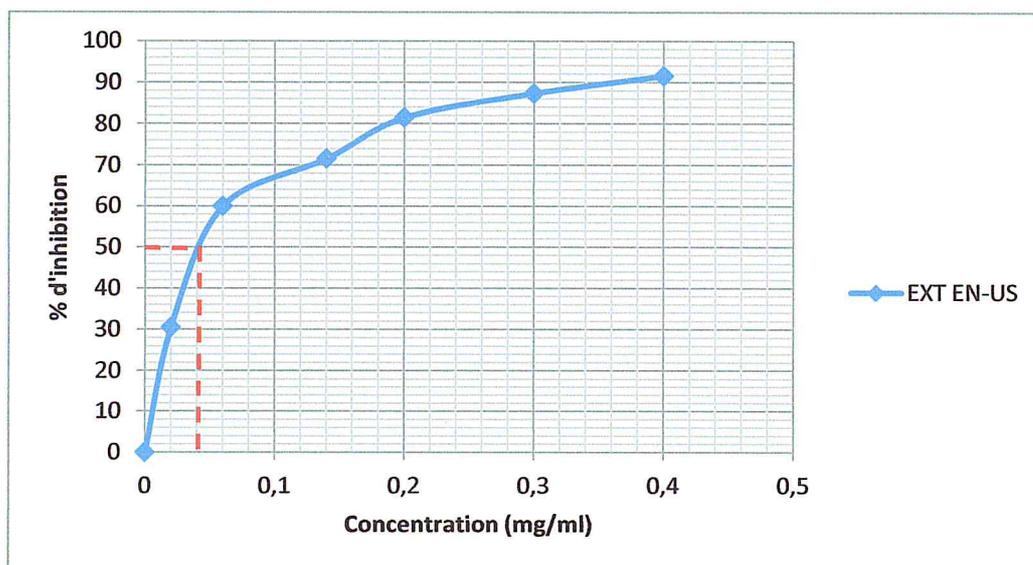


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Linum usitatissimum* (enz+ultrasons)

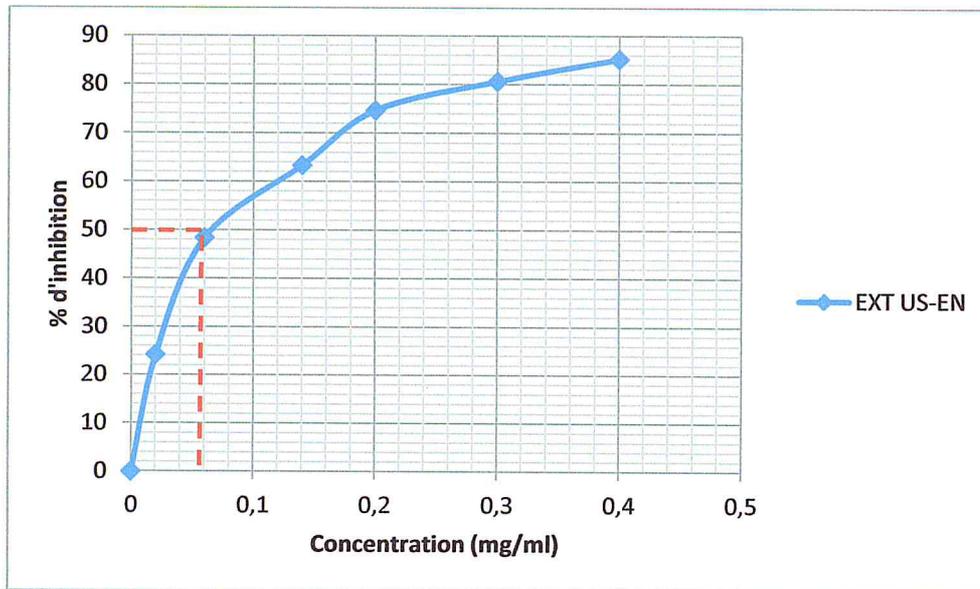


Figure 31 : Pourcentage d’inhibition du radical libre DPPH d’extrait de *Linum usitatissimum* (ultrasons+enzym)

Le paramètre IC_{50} qui est inversement proportionnel au potentiel d’anti radicalaire d’un antioxydant ($ARP = 1 / IC_{50}$). Une valeur IC_{50} faible correspond à une activité élevée. Ces IC_{50} sont déterminées à partir des graphes (figure N°25-31). Pour caractériser le pouvoir anti-radicalaire ARP, nous avons calculé ce paramètre et illustré graphiquement afin de comparer et justifier nos résultats.

Tableau 12 : La variation les valeurs d’ IC_{50} et ARP pour chaque extrait et pour l’antioxydant standard.

	Vit (C)	Lin macération classique	Lin avec délipidation assisté par US	Lin sans délipidation assisté par US	Lin PEN	Lin (EN-US)	Lin (US-EN)
IC₅₀ (mg/ml)	0.035	0.05	0.04	0.1	0.04	0.04	0.07
ARP	28.57	20	25	10	25	25	14.29

Les résultats montrent que les lignanes présentent un pouvoir antioxydant élevé. Les extraits des lignanes des graines de *Linum usitatissimum* avec délipidation assistés par ultrasons, les lignanes obtenus avec le prétraitement enzymatique de la graine et les extraits des lignanes prétraités enzymatiquement assistés par ultrasons (IC₅₀ égale à 0,04 mg/ml) présentaient le pouvoir antioxydant le plus élevé, en les comparant à l'acide ascorbique (IC₅₀ égale à 0,035 mg/ml). Tandis que ; les lignanes obtenus à partir du lin sans délipidation assisté par ultrason présentait le pouvoir antioxydant le plus faible.

- Graines de *Sesamum indicum*

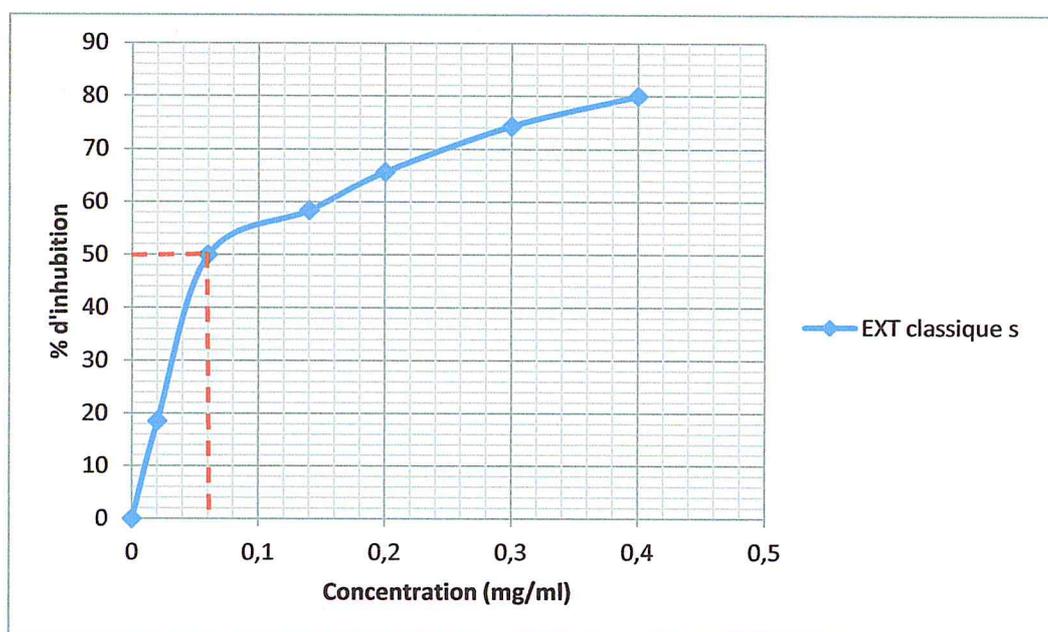


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum* classique

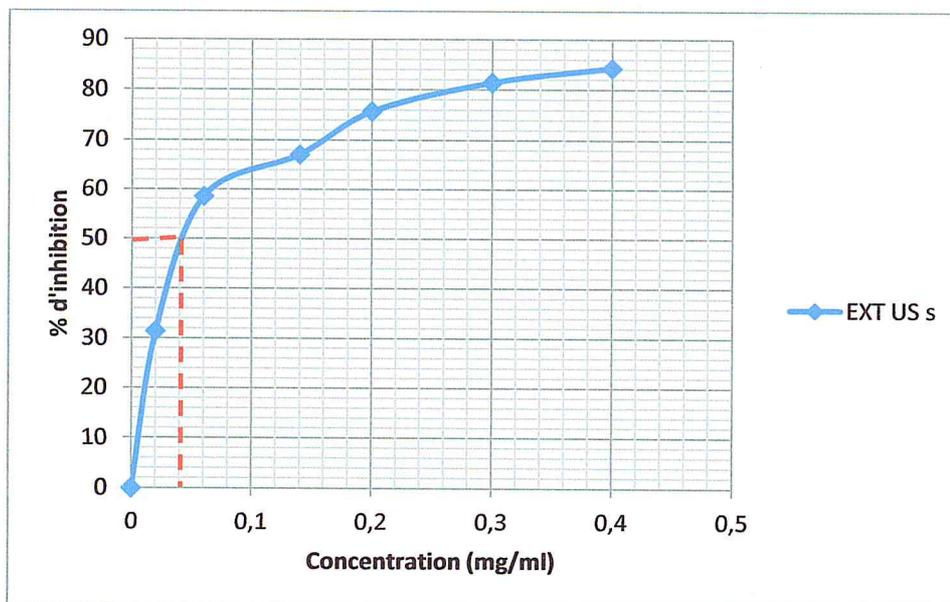


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum*
Assisté par Ultrasons

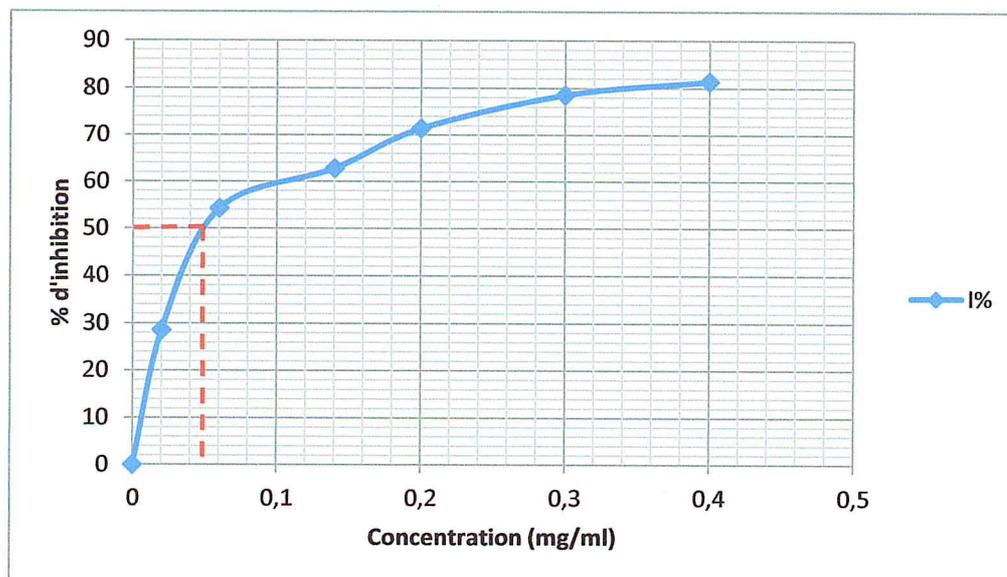


Figure 34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum*
traité avec l'enzyme

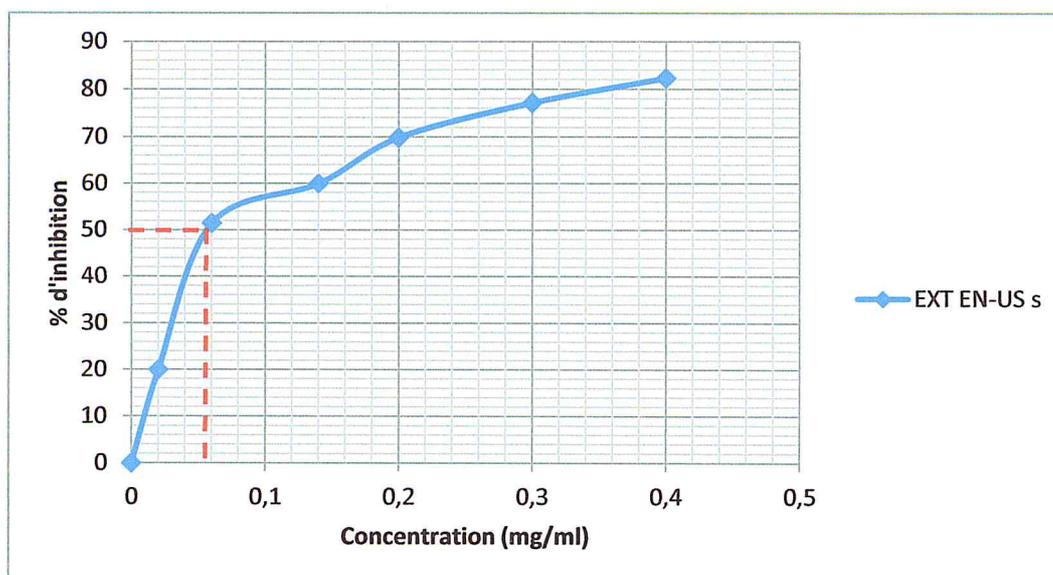


Figure 35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'extrait de *Sesamum indicum* Enz/US

Tableau 13 : La variation des valeurs d'IC₅₀ et ARP pour chaque extrait et pour l'antioxydant standard.

	Vit (C)	Graines de sésame macération classique	Graines de sésame assisté à US	Graines de sésame PEN	Graines de sésame assisté EN-US
IC₅₀ (mg/ml)	0.035	0.06	0.04	0.05	0.06
ARP	28.57	16.67	25	20	16.67

Les résultats ont montré que les lignanes de graines de sésame obtenus par extraction assistée par ultrasons présentent le pouvoir antiradicalaire le plus fort (IC₅₀ égale à 0.04mg/mL), suivi par celui de les lignanes obtenus à partir des graines de sésame prétraités enzymatiquement (0.05 mg/mL), comparativement à l'acide ascorbique (0.035mg/mL).

V.5 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits éthanoliques de *Linum usitatissimum* L est testée vis-à-vis de quatre souches bactériennes via la méthode de diffusion sur disque.

Tableau 14 : Activité antibactérienne des lignanes et zone d'inhibition des souches bactériennes (mm).

extraits	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Lin macération classique	12 mm	14mm	< 8mm	< 8mm
Lin délipidé US	< 8mm	14mm	14 mm	< 8mm
Lin sans délipidation/US	< 8mm	14 mm	< 8mm	< 8mm
Lin (PEN)	11 mm	< 8mm	< 8mm	10 mm
Lin (EN-US)	< 8mm	14 mm	< 8mm	< 8mm
Lin (US-EN)	11mm	< 8mm	12 mm	< 8mm
Sesamemacération classique	< 8mm	< 8mm	< 8mm	< 8mm
Sésame PEN	< 8mm	10 mm	< 8mm	12 mm
Sésame US	< 8mm	11 mm	12 mm	< 8mm
Sésame (EN-US)	11 mm	< 8mm	10 mm	11 mm

L'examen du tableau montre que presque toutes les souches bactériennes présentent une sensibilité faible vis-à-vis les lignanes avec une zone d'inhibition comprise entre 10mm et 14mm. Cependant, les extraits présentant une zone d'inhibition (<8 mm) , montrent une résistance vis-à-vis les souches bactériennes testées.

Tableau 15 : Activité antifongique de et zone d'inhibition des souches fongiques (mm).

	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus</i>
Lin classique	10 mm	< 8mm	< 8mm
Lin US	< 8mm	< 8mm	< 8mm
Linsansdélipidation/US	< 8mm	< 8mm	< 8mm
Lin PEN	10 mm	< 8mm	< 8mm
Lin (EN-US)	< 8mm	11 mm	11 mm
Lin (US-EN)	12 mm	10 mm	< 8mm
Sésame classique	< 8mm	< 8mm	10 mm
Sésame (PEN)	< 8mm	< 8mm	14 mm
Sésame (US)	< 8mm	< 8mm	< 8mm
Sésame (EN-US)	< 8mm	< 8mm	< 8mm

L'examen du tableau montre que presque toutes les souches fongiques ne présentent pas une sensibilité vis-à-vis les extraits lignanes avec une zone d'inhibition (<8 mm), sauf pour quelques extraits dont les souches fongiques sont peu sensibles vis-à-vis nos extraits avec une zone d'inhibition comprises entre 10mm et 12 mm.

On peut conclure que les lignanes extraites par les différents procédés d'extraction présentent une faible activité antimicrobienne.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Le présent travail a porté sur l'extraction des lignanes de deux espèces : graines de *Linum usitatissimum* et graines de *Sesamum indicum* de la famille *Linaceae* et la famille *Pedaliaceae* extraits par différentes méthodes d'extraction et leurs activités biologiques (anti oxydante et antimicrobienne). Ces graines sont largement utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, pour le traitement de plusieurs pathologies.

Les résultats ont montré que le meilleur rendement d'extraction des lignanes (15.75%) a été obtenu avec l'extraction assistée par la cellulase avec les graines de *Linum usitatissimum* et pour les graines de *Sesamum indicum*, le meilleur rendement est (1.98%) obtenu par extraction assistée par hydrolyse enzymatique/Ultrasons

La teneur en polyphénols totaux pour les deux extraits a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *Linum usitatissimum* par ultrasons 2.7975 mgEAG/g suite de l'extrait de macération contient 1 mgEAG/g, les résultats montrent que ultrasons est préférable pour l'extraction obtenu.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de lignanes a été testée par la méthode de piégeage de radical libre DPPH. Les résultats ont montré que les lignanes présentaient un pouvoir antioxydant élevé.

Il a été montré que les extraits des lignanes des graines de *Linum usitatissimum* avec délipidation assistés par ultrasons, les lignanes obtenu par le prétraitement enzymatique et les extraits des lignanes prétraités enzymatiquement assistés par ultrasons (IC_{50} égale à 0,04 mg/ml) présentaient le pouvoir antioxydant le plus élevé, comparativement à l'acide ascorbique(IC_{50} égale à 0.035 mg/ml).

Les résultats ont montré que les lignanes de graines de sésame obtenus par extraction assistée par ultrasons présentaient le pouvoir antiradicalaire le plus fort (IC_{50} égale à 0.04mg/mL), suivi par celui de les lignanes obtenus à partir des graines de sésame prétraités enzymatiquement (0.05 mg/mL), comparativement à l'acide ascorbique (0.035mg/mL)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que les lignanes extraites par les différents procédés d'extraction présentaient une faible activité antimicrobienne et une sensibilité faible vis-à-vis les souches testées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]. E. Lainé, C. Hano, F. Lamblin, « Les lignanes phytoestrogènes du lin sont-ils des bienfaiteurs méconnus ? ». *Phytothérapie* 5: 121–128, 2007.
- [2]. R. YAACOUB, « Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux intérêt de la fluorescence comme outil ». Thèse de doctorat : Chimie Analytique. Paris : l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, 2010.
- [3]. S. ASJEL, « Etude phytochimique et biologique d'*Ammodaucus leucotrichus* ». Thèse de magistère : Chimie Organique. Université d'Oran, 2011.
- [4]. R. SAVOIRE, « Etude multi - échelles de la séparation solide - liquide dans la trituration du lin oléagineux ». Thèse de doctorat : Génie des Procédés Industriels. Université de technologie Compiègne, 2008.
- [5]. S. RENOUARD, « Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des lignanes du lin (*Linum usitatissimum* et *Linum flavum*) et amélioration de l'extraction des lignanes ». Thèse de doctorat : Sciences du vivant. Université d'Orléans, 2011.
- [6]. E. S. Oplinger, E. A. Oelke, J. D. Doll, L. G. Bundy, R. T. Schuler, (page mise à jour le 8 janvier 2008) Flax <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/flax.html>.
- [7]. J. Bruneton, « *Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales* » 4^e éd : éditions Lavoisier Tec & Doc Paris, France. 131-134 pp, 2009.
- [8]. F. Nolin, « Hétérogénéité et spécificité de la lignification chez le lin (*Linum usitatissimum*) : Etudes microscopique et biochimiques de la polymérisation des lignines ». Thèse de doctorat : Stratégie d'Exploitation des Fonctions Biologiques. Université de Lille1, 2009.
- [9]. FAO (2012) Guide pratique - Stockage et conservation des grains à la ferme. site consulté le 13 mars 2012.
- [10]. M. Kadivar, « Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from Solin (low linolenic acid flax) ». PhD, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 177 pp, 2001.
- [11]. B. D. Oomah, G. Mazza, « Flaxseed proteins—a review » . *Food Chemistry*, 48, 109-114 pp, 1993.
- [12]. C. I. Hall, M. C. Tulbek, Y. Xu, Flaxseed. « *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, 1-97 pp, 2006.

Références bibliographiques

- [13]. B. D. Oomah, « Processing of flaxseed fiber, oil, protein, and lignan. *dans: Flaxseed in Human Nutrition* », *Second Edition*. Eds Thompson, L. U., Cunnane S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 20, 363-387 pp, 2003.
- [14]. J. Daun, V. Barthet, T. Chornick, S. Duguid, « Structure, composition, and variety development of flaxseed ». *dans: Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition*. Eds Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1-40 pp, 2003.
- [15]. B. D. Oomah, E. O. Kenaschuk, G. Mazza, « Phenolic acids in flaxseed ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2016-2019 pp, 2015.
- [16]. N. ROMBAUT, « Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin ». Thèse de doctorat : Génie des Procédés Industriels. Université de technologie Compiègne, 2013.
- [17]. C. Eliasson, A. Kamal-Eldin, R. Andersson, P. Åman, « High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction ». *Journal of Chromatography A*, 1012, 151-159 pp, 2003.
- [18]. A. K. Smith, V. L. Johnsen, A. C. Beckel, « Linseed proteins: Alkali dispersion and acid precipitation. *Industrial and Engineering Chemistry* », 353-356 pp, 1946.
- [19]. H. LAHSISSENE, A. KAHOUADJI, M. TIJANE, S.HSEINI, LEJEUNIA, *CATALOGUE DES PLANTES MEDICINALES UTILISEES DANS LA REGION DE ZAËR (MAROC OCCIDENTAL)* [en ligne] 186 3, Disponible sur : <http://popups.ulg.ac.be/0457-4184/index.php?id=713&file=1&pid=701> [Consulté Décembre 2009].
- [20]. L. A. Johnson, T. M. Suleiman, E. W. Lusas, « Sesame protein: A review and prospectus. *Journal of American Oil Chemists Society*, 6, 463-468 pp, 1979.
- [21]. R. Paris, « *Précis de matière médicale*. 3^{ème} éd ». Paris : Masson & C^{ie}. 249-251 pp, 1971.
- [22]. I. E. Milder, I. C. Arts, Van de Putte, B., Venema, D. P., Hollman, P. C. « Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 2005, 93 (3), 393-402.
- [23]. R.V. Cooney, L.J. Custer, L. Okinaka, A.A. Franke, « Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels ». *Nutrition and Cancer*, 39 (1), 66-71 pp, 2001.

Références bibliographiques

- [24]. Ikeda, S. Kagaya, M., Kobayashi, K., Tohyama, T., Kiso, Y., Higuchi, N., Yamashita, K. « Dietary sesame lignans decrease lipid peroxidation in rats fed docosahexaenoic acid ». *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **49** (4), 270-276 pp, 2003.
- [25]. Hirata, F., Fujita, K., Ishikura, Y., Hosoda, K., Ishikawa, T., Nakamura, H. « Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans ». *Atherosclerosis*, **122** (1), 135-136 pp, 1996.
- [26]. S. M. Dagher, « Traditional foods in the Near East ». *Food and Nutrition paper (FAO)*, n° 50 / Rome (Italie), 1991, pp 131-135.
- [27]. Nkhili, Ez-zohra. « Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité: Sciences des Aliments ». Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier. 378p, 2004.
- [28]. A. Manallah, « Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L ». Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p, 2012.
- [29]. Leong et Shui, « Activite-antioxydante composees-phenoliques », 2003.
- [30]. GP. Moss, « Nomenclature of lignans and neolignans», (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* 72(7): 1493-1523 pp, 2000.
- [31]. T. Midoun, « Extraction Des Composes Phenoliques Et Etude Leurs Activités Antioxydante Par La Voltametrie Cyclique. Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Master, Spécialité : *chimie appliquée* ». Université Kasdi Merbah Ouargla. 53p, 2011.
- [32]. T. Umezawa, Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* 2(3): 371-390 pp, 2003.
- [33]. F. Lamblin, « Modulation des activités S-adénosylméthionine synthétase et pectine méthylestérase chez le lin (*Linum usitatissimum*) par transgénèse sens et antisens via *Agrobacterium tumefaciens* ». *Thèse Université de Picardie*, 1999.
- [34]. F. Lamblin, C. Hano, O. Fliniaux, F. Mesnard, MA. Fliniaux et E. Lainé, « Interest of lignans in prevention and treatment of cancers », 2008.
- [35]. J. McDill, M. Replinger, B. Simpson, et JW. « Kadereit, The phylogeny of *Linum* and Linaceae subfamily Linoideae, with implications for their systematics, biogeography, and evolution of heterostyly ». *Syst. Bot.* 34(2): 386-405 pp, 2009.
- [36]. S. Hemmati, Von Heimendahl CB, M. Klaes, AW. Alfermann, TJ. Schmidt et E. Fuss. « Pinoresinol-lariciresinol reductases with opposite enantiospecificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L» . *Planta Med*, 2010.

Références bibliographiques

- [37]. K. Struijs, JP. Vincken, Doeswijk TG, Voragen AGJ et H. « Gruppen The chain length of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides » . *Phytochemistry*, 2009.
- [38]. I. Popova ,A. Hall CetKubátová, « Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry ». *J. Chromatogr A*. 1216(2):217-229, 2009.
- [39]. Z. Zhang, Dong Li, Li-Jun Wang, N. Ozkan , X. Chen, Z. Mao, H. Yang; «Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed »; 2007.
- [40]. S. Veillet, V. Tomao, F. Chemat ; « Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants ». Dans F. Chemat (Ed) Essential oil and aromas green extractions and applications, HKB, New Delhi, Inde ; 2009.
- [41]. S. Veillet, « Enrichissement nutritionnel de l’huile d’olive : Entre Tradition et Innovation », Thèse de doctorat, Université d’Avignon et des Pays de Vaucluse. France ; 2010.
- [42]. C. Corbin, T. Fidel, E. Leclerc, E. Barakzoy, N. Sagot, A. Falguières, S. Renouard, J. Blondeau, C. Ferroud, J. Doussot, « Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds »; Paris ; 2015.
- [43]. J. Barrow, « Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants.Trends in biotechnology », vol.30,n°1.2012.
- [44]. L. Wang, Y. Zhang, P. Li, X. Wang. W. Zhang, W. Wei, X. Zhang; « HPLC Analysis of Seed Sesamin and Sesamolol Variation in a Sesame Germplasm Collection in China »; Chine ; 2011.
- [45]. A. Dar, N. Verma, N. Arumugam ; « An updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans – Sesamin and sesamolol, from sesame oil »; Inde ; 2014.
- [46]. R. HEBBAB, « Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margine d’olive de la variété Chamlal : evaluation de l’activité avant et après déglycosylation », Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2014.
- [47]. J. BLOUIN, L. LLORCA, F-R. MONTREAU, J-H. DUFOUR , « Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de FolinCiocalteu », *Connaissance de la vigne et du vin*, vol 6, 405-413 pp, 1972.

Références bibliographiques

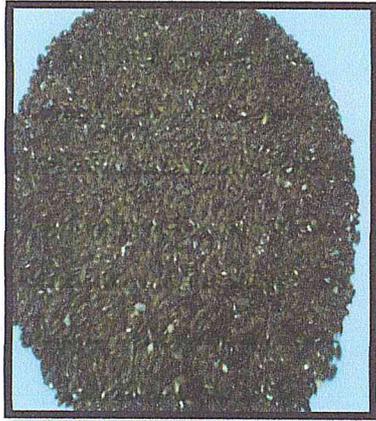
- [48]. D. DE BEER, E. JOUBERT, W. « GELDERBLON, Antioxidant activity of S South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* », 51(4), 902-9.
- [49]. C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, « A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*», 76, 270-276; 2009.
- [50]. H. Labadie ; «*Vitamine C. Du scorbut à l'équilibre vitaminique idéal*». Press Med., 20 (1991) 2156-2158
- [51]. C. POPOVICI, I. SAYKOVA, B. TYLKOWSKI, « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH », *Génie industriel*, vol 4, 25-39 pp, 2009.
- [52]. S. KHOUDALI, D. BENMESSAOUD, A. ESSAQUI, M. ZERTOUBI, M. AZZI, M. BENAÏSSA ; « Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) Du Maroc», vol 5, 887-898 pp, 2014.
- [53]. C. Duraffourd, J-C. Lapraz, R. Chemli. « La plante médicinale de la tradition à la science. 1^{er} congrés international ». Tunis. Ed. Granche. Paris, p222 .1997.

Annexes

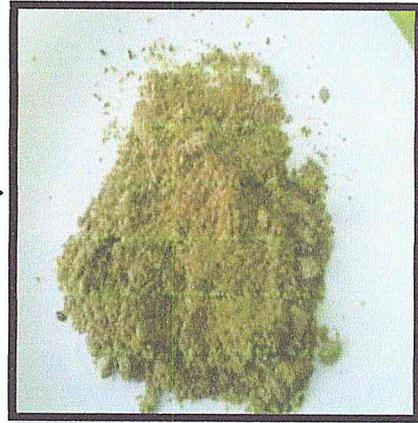
Annexes

Annexe 1

Préparation de la matière végétale *Linum usitatissimum*



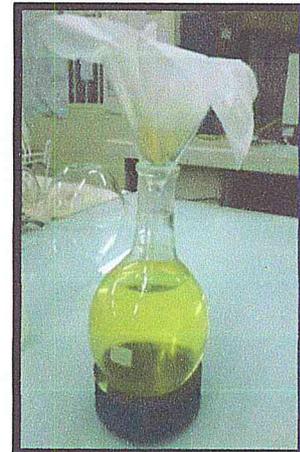
Broyage



Macération dans
l'hexane pendant
12 h et filtré



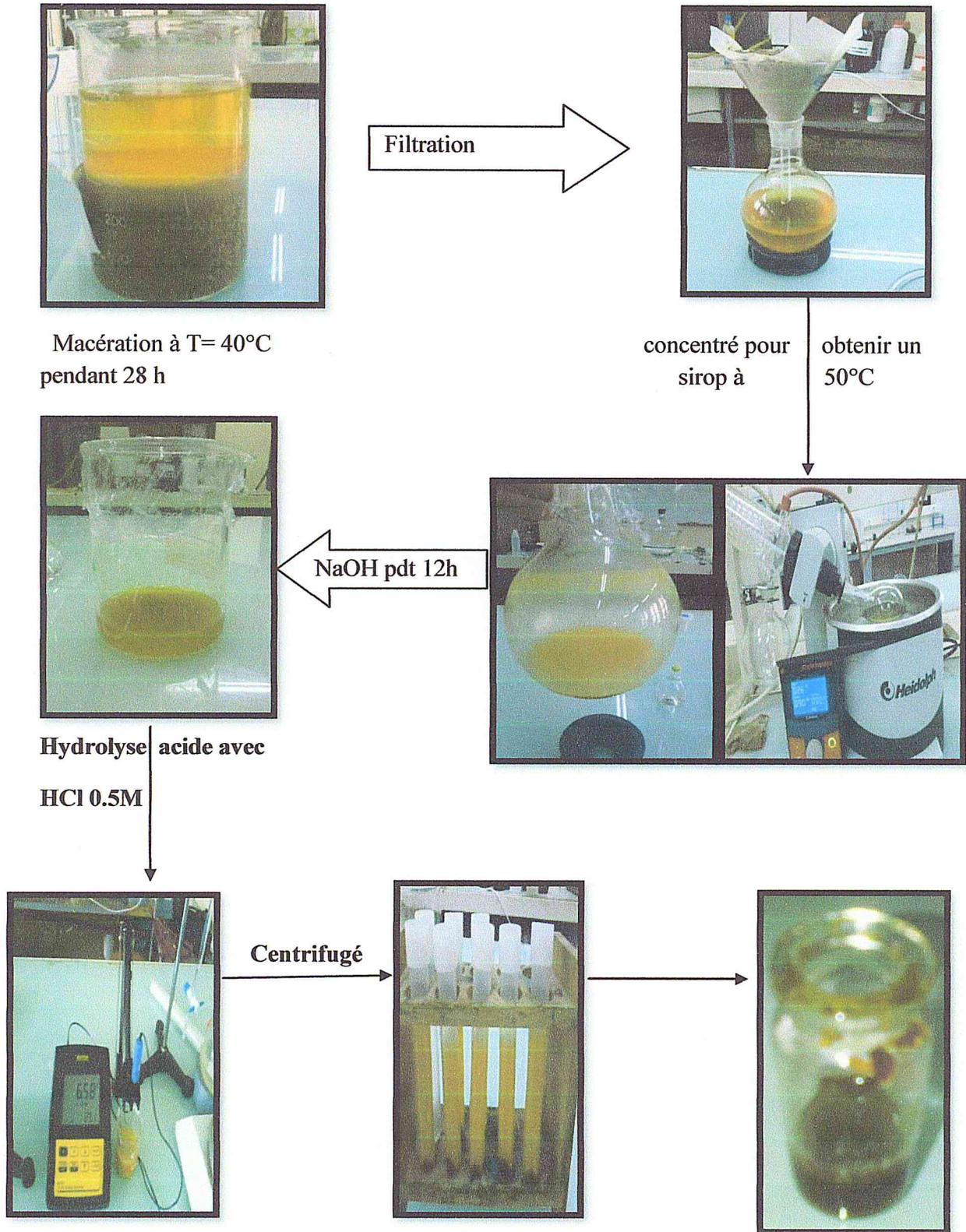
Séchage



Annexes

Annexe 2

Les étapes d'extraction des lignanes à partir des graines de *Linum usitatissimum* :



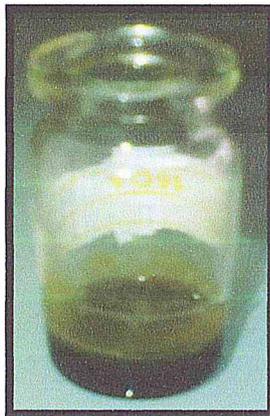
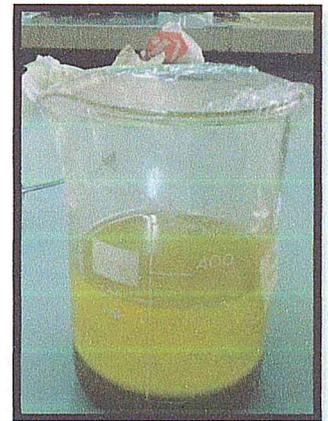
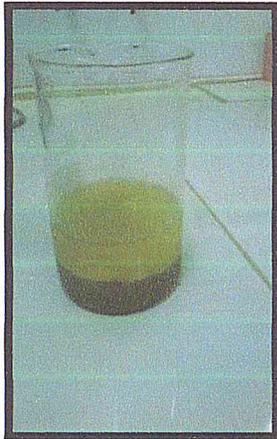
Annexes

Annexes 3

Extraction assisté par ultrasons



Macération dans un bain ultrasonique à $T=30^{\circ}\text{C}$
pendant 1h



Extrait ultrasonique
Délipidé

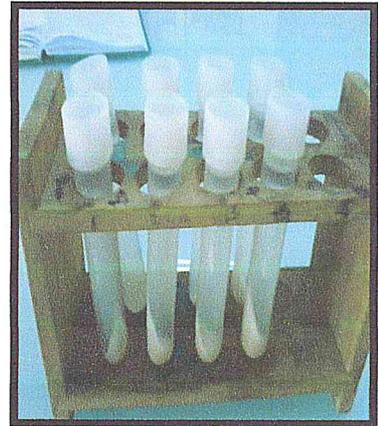
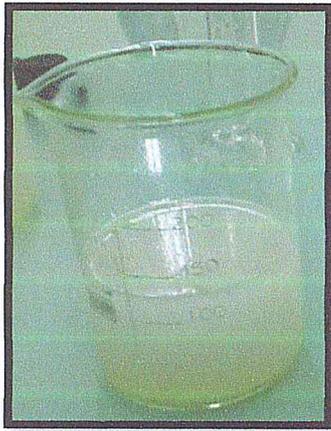
Extrait ultrasonique
enzymatique

Extrait ultrasonique
non délipidé

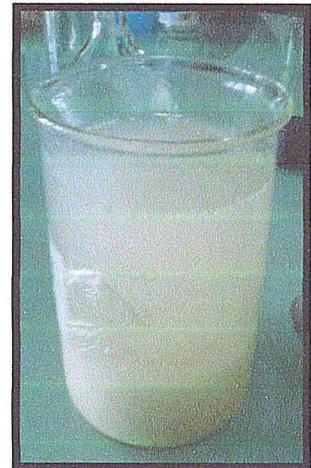
Annexes

Annexe 4

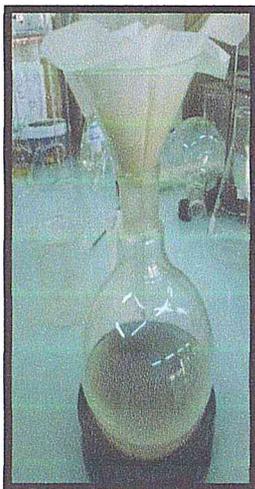
Les étapes d'extraction des lignanes à partir des graines de *Sesamum indicum*:



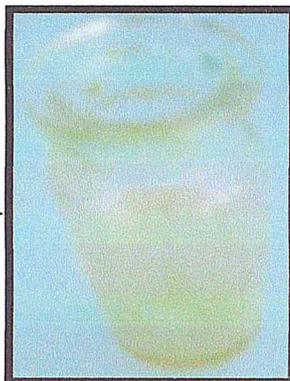
Macération I à température ambiante pendant 24 h



Filtration



évaporation



Extrait classique

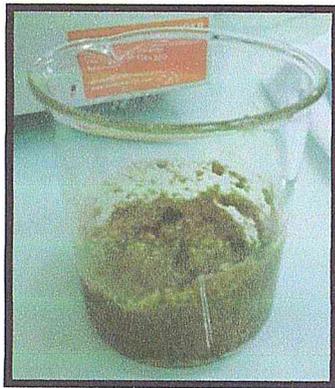
Macération II dans

Les mêmes conditions

Annexes

Annexe 5

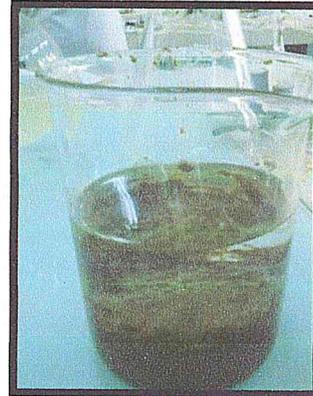
Extraction par hydrolyse enzymatique



Après incubation dans

Dans l'étuve à $T=50^{\circ}\text{C}$

Pendant 2h

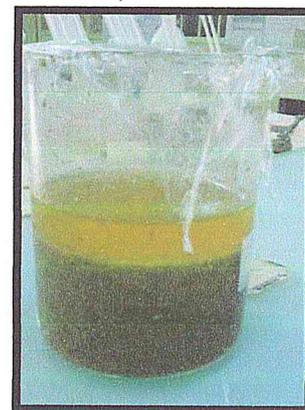


Hydrolyse enzymatique à $\text{pH}=4$



Macération ultrasonique à $T=30^{\circ}\text{C}$

Pendant 1h



Macération classique



Extrait enzymatique ultrasonique



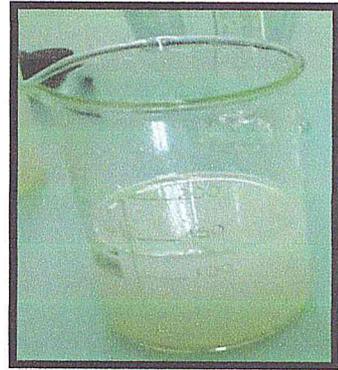
Extrait enzymatique

Annexes

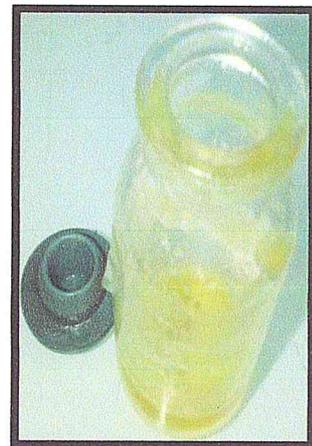
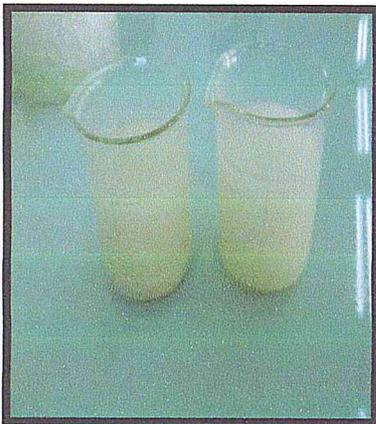
Annexe 6



**Macération ultrasonique et
enzymatique ultrasonique**



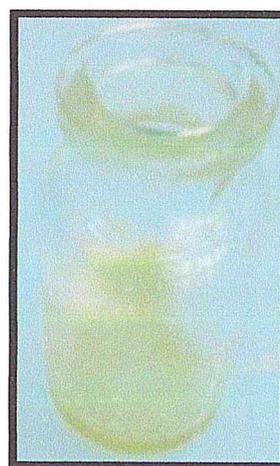
hydrolyse enzymatique



Extrait enzymatique



Extrait ultrasonique



Extrait enzymatique ultrasonique

Annexes

Annexe 7

- Préparation des solutions étudiées dans le dosage des composés phénoliques par Calorimétrie « Follin Ciocalteu »

➤ Préparation de la solution mère:

Puisque notre droite d'étalonnage a été effectuée par l'acide gallique, une masse de 20mg de ce acide a été dissout dans 10ml de solvant (Ethanol/Eau 50/50%) afin d'obtenir une concentration de 2mg/ml.

➤ Préparation des solutions filles:

Afin de préparer les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage nous avons utilisé la relation:

$$C_{\text{sol mère}} \cdot V_{\text{prélevé}} = C_{\text{sol fille}} \cdot V_{\text{sol fille}}$$

- Prélever 30 μl de solution mère et leur ajouter 1.97ml de solvant \rightarrow 0.03mg/ml ;
- Prélever 60 μl de solution mère et leur ajouter 1.94ml de solvant \rightarrow 0.06mg/ml ;
- Prélever 90 μl de solution mère et leur ajouter 1.91ml de solvant \rightarrow 0.09mg/ml ;
- Prélever 120 μl de solution mère et leur ajouter 1.88ml de solvant \rightarrow 0.12mg/ml ;
- Prélever 250 μl de solution mère et leur ajouter 1.75ml de solvant \rightarrow 0.25mg/ml ;
- Prélever 500 μl de solution mère et leur ajouter 1.5ml de solvant \rightarrow 0.5mg/ml ;
- Prélever 750 μl de solution mère et leur ajouter 1.25ml de solvant \rightarrow 0.75mg/ml ;
- Prélever 1 ml de solution mère et leur ajouter 1.ml de solvant \rightarrow 1mg/ml.

Figure : dosage polyphénols totaux des extraits éthanoliques de *Linum usitatissimum*

Annexes

Annexe 8

- **Test de piégeage du radical libre DPPH**

- Préparation de la solution de DPPH:

Une solution de DPPH de concentration de 0.04mg/ml a été préparée à partir de dissolution de 4mg de poudre de DPPH dans 100ml de méthanol. Nous avons couvrir la fiole par l'aluminium afin d'éviter la dégradation de cette solution.

- Préparation de la solution mère :

Nous avons préparé une solution mère de 2mg/ml. Une masse de 20 mg a été dissout dans 10 ml de solvant.

Préparation des solutions filles:

- Prélever 20 μ l de solution mère et leur ajouter 1.98ml de solvant \rightarrow 0.02mg/ml ;
- Prélever 40 μ l de solution mère et leur ajouter 1.96ml de solvant \rightarrow 0.04 mg/ml ;
- Prélever 60 μ l de solution mère et leur ajouter 1.94ml de solvant \rightarrow 0.06mg/ml ;
- Prélever 80 μ l de solution mère et leur ajouter 1.92ml de solvant \rightarrow 0.08mg/ml ;
- Prélever 100 μ l de solution mère et leur ajouter 1.9ml de solvant \rightarrow 0.10mg/ml ;
- Prélever 120 μ l de solution mère et leur ajouter 1.88ml de solvant \rightarrow 0.12mg/ml ;
- Prélever 140 μ l de solution mère et leur ajouter 1.86ml de solvant \rightarrow 0.14mg/ml ;
- Prélever 160 μ l de solution mère et leur ajouter 1.84ml de solvant \rightarrow 0.16mg/ml ;
- Prélever 180 μ l de solution mère et leur ajouter 1.82ml de solvant \rightarrow 0.18mg/ml ;
- Prélever 200 μ l de solution mère et leur ajouter 1.82ml de solvant \rightarrow 0.2mg/ml ;
- Prélever 300 μ l de solution mère et leur ajouter 1.82ml de solvant \rightarrow 0.3mg/ml ;
- Prélever 400 μ l de solution mère et leur ajouter 1.82ml de solvant \rightarrow 0.4mg/ml ;

Annexes

Tableau : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des antioxydants standards Vit C.

Concentration n mg/ml	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.14	0.18	0.2	0.3	0.4
Absorbance	0.213	0.139	0.101	0.078	0.064	0.043	0.031	0.029	0.020	0.017
% d'inhibition	0	34.7	52.58	63.38	69.95	79.81	85.44	86.38	90.61	92.01

Tableau : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits éthanoliques de *Linum usitatissimum*.

C (mg/ml)	0.02	0.06	0.14	0.2	0.3	0.4
Abs CL	0.069	0.045	0.033	0.022	0.19	0.012
I% CL	27.36	52.63	65.26	76.84	80	87.89
Abs ULT	0.050	0.036	0.024	0.016	0.013	0.007
I% ULT	33.65	62.1	74.73	83.15	86.31	92.63
Abs non	0.077	0.06	0.039	0.032	0.027	0.021
I% non	18.94	36.84	58.94	66.31	71.57	77.89
Abs ENZ	0.064	0.045	0.029	0.02	0.016	0.01
I%ENZ	32.63	57.89	69.47	78.94	83.57	89.47
Abs	0.066	0.038	0.027	0.0176	0.12	0.008
En+ultr						
I% En+ultr	30.55	60	71.57	81.47	87.36	91.57
Abs	0.071	0.049	0.031	0.023	0.018	0.014
Ult+en						
I% Ultr+en	24.21	48.42	67.36	75.78	81.05	85.26

Tableau : La variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits éthanoliques de *Sesamum indicum*.

C (mg/ml)	0.02	0.06	0.14	0.2	0.3	0.4
Abs CL	0.057	0.035	0.0291	0.024	0.018	0.014
I% CL	18.57	50	58.42	65.71	74.28	80
Abs ULT	0.048	0.029	0.023	0.017	0.013	0.011
I% ULT	31.42	58.57	67.14	75.71	81.42	84.28
Abs ENZ	0.050	0.032	0.026	0.020	0.015	0.013
I%ENZ	27.57	54.28	62.85	71.42	78.57	81.42
Abs	0.056	0.030	0.028	0.011	0.016	0.0123
En+ultr						
I% En+ultr	20	51.42	60	69.85	77.54	82.28

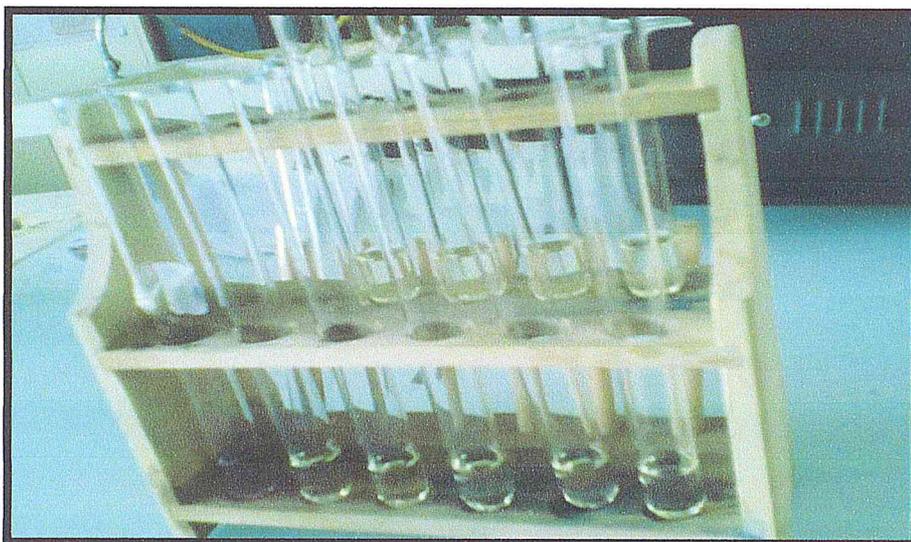


Figure : Photographie représentative du changement de couleur de violette à jaune pâle de l'acide ascorbique au test de DPPH

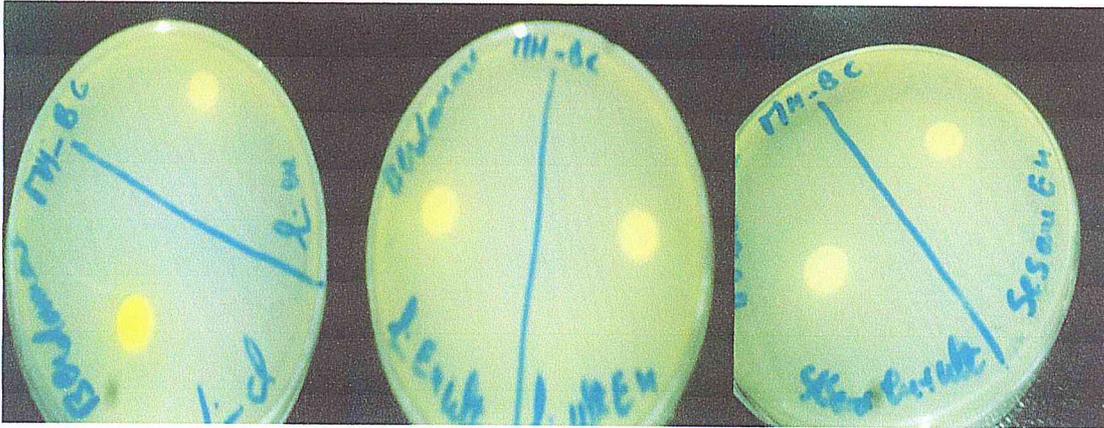
Figure : Photographie représentative du changement de couleur de violette à jaune pâle de la gamme étudiée au test de DPPH

Annexes

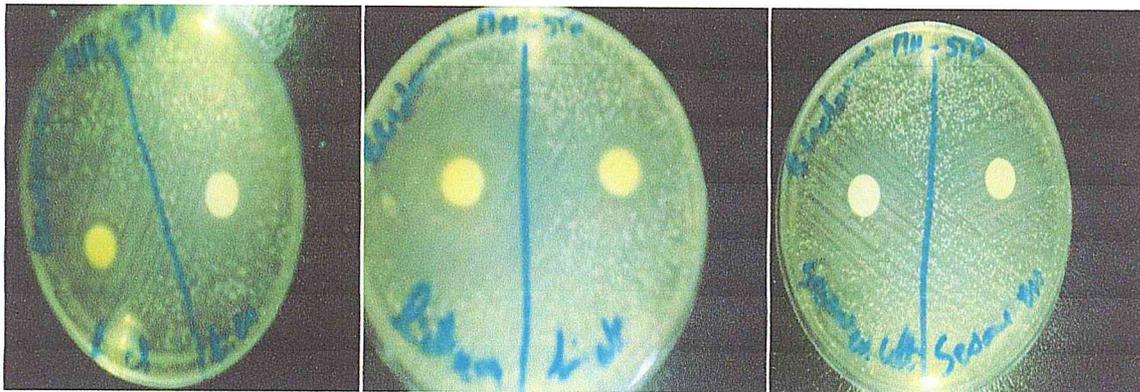
Annexe 9

Activité antibactérienne

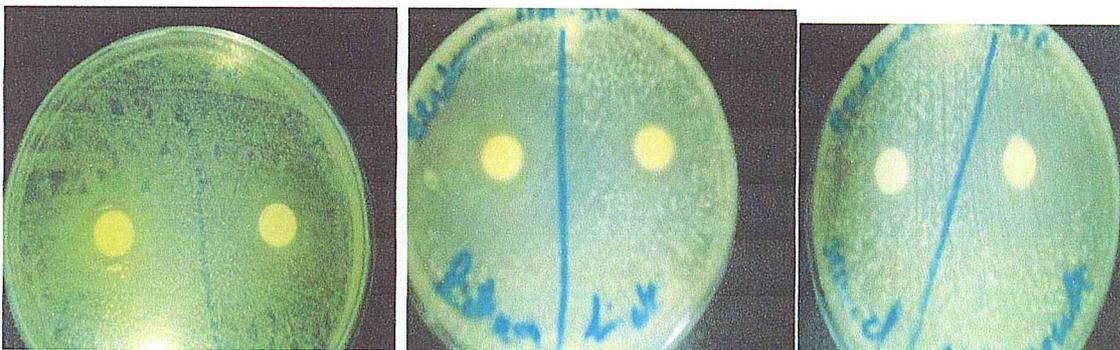
Effets quelques extraits sur la souche bactérienne *Bacillus subtilis*



Effets quelques extraits sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*



Effets quelques extraits sur la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*

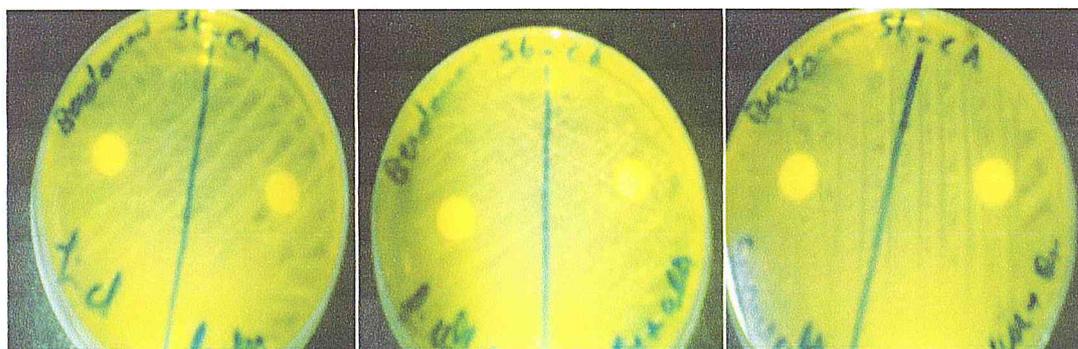


Annexes

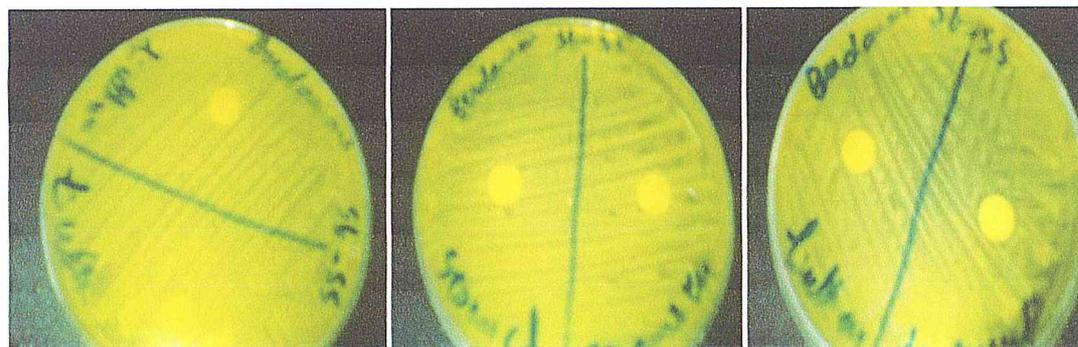
Effets quelques extraits sur la souche bactérienne *Escherichia coli*



Effets quelques extraits sur la souche fongique *Candida albicans*



Effets quelques extraits sur la souche fongique *Saccharomyces cerevisiae*



Effets quelques extraits sur la souche fongique *Aspergillus*

