



N° d'ordre : Doc/ /2016

THÈSE

PRÉSENTÉE A
L'UNIVERSITE KASDI MERBAH- OUARGLA
FACULTE DES MATHÉMATIQUES ET SCIENCES DE LA MATIÈRE
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR EN SCIENCES

SPÉCIALITÉ : Chimie
OPTION : Chimie organique

PAR :

Mohamed BENALIA

Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées

SAIDI Mokhtar	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Président
DENDOUGUI Hocine	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Examineur
NADJEMI Boubakeur	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examineur
BOUDJENIBA Messaoud	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examineur
HADJADJ Mohamed	MCA	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Examineur
YOUSFI Mohamed	Professeur	Université Amar Telidji de Laghouat	Directeur de thèse

Je dédie ces quelques pages

A la mémoire de mon cher Père

A ma chère mère

A ma très chère épouse ; c'est mon bonheur

A mes très chers Enfants

A mon groupe de travail

A tous ceux qui me sont chers : grande famille et mes amis

En témoignage de ma profonde affection

*La réalisation de ce travail a été achevée au Laboratoire des Sciences Fondamentales LSF à l'université de Laghouat sous la direction du directeur de ce laboratoire professeur **Mohamed Yousfi** ; a qui j'adresse ma gratitude et ma profonde reconnaissance d'avoir accepté d'être rapporteur et membre du jury de ma thèse. Je le remercie très chaleureusement pour toute l'aide, les conseils et les expériences scientifiques qu'il m'a apportés.*

Malgré les apparences, cette page est la plus difficile à rédiger. En effet, comment dire en si peu de mots toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont toujours encouragé. Malgré tout, ces quelques lignes sont une occasion pour moi de remercier les responsables et les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu de diverses manières et sans qui, ce travail n'aurait pas abouti.

*Mes plus vifs remerciements et reconnaissances les plus dévouées à mon frère collègue **Amar DJERIDANE**, Docteur en Chimie à l'université de Laghouat Amar Telidji, qui a co-dirigé ce travail. Il ne sera jamais assez pour lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance, le grand soutien et la disponibilité dont j'ai bénéficié auprès de lui lors de la réalisation de ce travail malgré ses occupations, il m'a consacré énormément de temps pour me transmettre une partie de son savoir en qualité de chimiste.*

*J'ai largement profité de mon séjour au laboratoire Biosciences à l'Université Paul Cézanne de Marseille grâce au docteur **Elhasan Ajandouz** qui était mon superviseur. Je dois le remercier pour m'avoir facilité l'accès au matériel disponible et de m'avoir permis de profiter de sa riche expérience.*

Ainsi, j'adresse ma gratitude et mon honneur respec:

- *A Monsieur **Mokhtar SAIDI**, Professeur à l'université d'Ourgla Kasdi Merbah, pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. J'aimerais le remercier*
- *A Monsieur **Boubakeur NEDJEMI** et Monsieur **Messaoud BOUDJENIBA**, Professeurs à l'Ecole Normale Supérieure d'Alger, pour avoir accepté d'être rapporteurs et de faire le déplacement dur de l'école supérieure d'Alger pour participer au jury de cette Thèse.*
- *A Monsieur **Hocine DENDOUGUI** et Monsieur **Mohamed HADJADI**, Professeur et Maître de conférences respectivement à l'université Kasdi Merbah d'Ourgla, d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse ainsi que d'avoir bien voulu être membre de mon jury de soutenance. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à mes collègues enseignants chercheurs d'enseignement et du laboratoire de recherche LSF pour leurs soutiens permanents, Monsieur le professeur **Leffkaier Ibn Khaldoun**, **Nadhir GOURINE**, ainsi que Medames **Zineb HADBAOUI** et **Chahrazed HAMIA***

Je clos enfin ces remerciements en témoignant ma gratitude toute particulière à l'égard de toute ma famille, qui ma soutenu continuellement tout au long de ces années de travail.

القرع (اليقطين) *Cucurbita pepo* هو نبات يستخدم عادة لعلاج مجموعة واسعة من الأمراض. ولدعم ذلك، قمنا في هذه الأطروحة بدراسة التركيب الكيميائي من الأحماض الدهنية و الغليسيريدات الثلاثية وكذا التوكوفيرولات إضافة إلى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لكل من الليبيدات، مستخلصات الكسب البروتينية و الفينولية لثمانى عينات من بذور اليقطين (*Calebasse*) المزروعة في الجزائر.

أظهرت نتائج التحليل إلى أن بذور اليقطين غنية نسبيا بالدهون (15.8-33.5%) و أن الأحماض الدهنية السائدة هي : حمض البالمتيك C16 : 0 (13,9 – 20,0%)، حمض الستياريك C18 : 0 (9,6 – 17,7%) حمض الأوليك C18 : 1 (26,2 – 39,6%) و حمض اللينولييك C18 : 2 (28,7 – 44,0%). تفضل الأحماض الدهنية غير المشبعة C18 (الأوليك و اللينولييك) المكان الداخلي Sn-2 وان المجموعات الغالبة من الغليسيريدات الثلاثية هي GU₃ (ثلاثي اللاتشع) و GSU₂ (الاحادية التشبع).

يتراوح محتوى التوكوفيرولات في الزيت من 7,7 إلى 31,9 (ملغ /كغ) لـ α -tocophérol، من 39,3 إلى 155,1 (ملغ /كغ) لـ $(\beta+\gamma)$ -tocophérol و من 39,0 إلى 103 (ملغ /كغ) لـ δ -tocophérol. بينت نتائج المستخلصات البروتينية للكسب أن التقدير الكمي يتراوح من 20,427 إلى 57,225 (غ / 100 غ للكسب)، أما بالنسبة للمستخلصات الفينولية فيتراوح التقدير الكمي من 19,80 إلى 46,39 (ملغ / 100/GAE للكسب).

أظهرت نتائج تعيين القدرة على مقاومة الأكسدة باستعمال الطريقتين DPPH و الفوسفوموليبيدات (PPM) أن مستخلصات بذور اليقطين على قدر من الأهمية مقارنة مع مضادات الأكسدة المعيارية، وأنها تمتلك قدرة في مواجهة الجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية : زيت القرع، الأحماض الدهنية، التوكوفيرولات، البروتينات، متعدد الفينولات، الفعالية المضادة للأكسدة.

La *Cucurbita pepo* (citrouille) est un fruit qui est traditionnellement utilisé pour traiter une grande variété de maladies, Cependant, il y a un besoin de données plus scientifiques pour appuyer ces diverses allégations de santé. Ce travail est consacré à l'étude de la composition chimique en acides gras, en triglycérides et en tocophérols, et d'évaluer l'activité antioxydante des lipides, des extraits protéiques et des extraits phénoliques préparés à partir de huit échantillons de graines de citrouille cultivés en Algérie.

Les résultats indiquent que les graines de citrouille sont relativement riches en huile (15,8 à 33,5%) et que les AGs dominants trouvés dans les huiles étudiées sont: le palmitique C16:0 (13,9 à 20,0%), l'acide l'acide stéarique C18 :0 (9,6 à 17,7%), l'acide oléique C18:1 (26,2 à 39,6%) et l'acide linoléique C18:2 (28,7 à 44,0 %). La position Sn-2 est préférentiellement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique), résultats déjà publiés pour plusieurs huiles d'origines végétales. Les principales catégories en tant que composés de majoritaires sont GU₃ (tri-insaturés) et GSU₂ (monosaturées). La teneur en tocophérol des huiles varie de 7,7 à 31.9 mg / kg d'huile pour α -tocophérol, de 39,3 à 155.1mg / kg pour (β + γ) tocophérol et de 39,0 à 103.0 mg / kg pour δ -tocophérol. L'analyse quantitative des extraits de protéines a fourni des teneurs allant de 20,427 et 57,225 g pour 100 g de tourteaux. Les quantités de composés polyphénols s'échelonnent entre 19,80 et 46,39 mg équivalent acide gallique (GAE) pour 100 g de tourteaux.

L'évaluation quantitative du pouvoir piégeur des extraits vis-à-vis du DPPH et la capacité réductrice des ions molybdène hexavalent, montrent que le niveau de l'activité antioxydante par ces deux dosages utilisés est significatif par rapport aux antioxydants standards. En outre, il a été démontré pour la première fois que les extraits de graines possédaient une bonne activité antioxydante qui peut être associée à leurs prestations de santé présumés.

Mots clés : huile de cucurbitacée, acides gras, tocophérols, protéines, polyphénols, activité antioxydante.

Abstract

Cucurbita Pepo (Pumpkin) is a fruit which is traditionally used to treat a wide variety of diseases, and through scientific investigation most of the properties have been validated. However, more scientific data is needed to support the various health claims. The aim of this study was to determine the fatty acids (FA) profile, tocopherols content and to evaluate the antioxidant activity of seeds oil, proteins and polyphenols extracts prepared from eight samples of seeds pumpkin cultivated in Algeria.

The results indicated that pumpkin seeds were rich in oil (15.8-33.5%) and the major unsaturated fatty acids were linoleic acid (28,7-44,0%) followed by oleic acid (26,2-39.6%), while the main saturated fatty acids were palmitic (13.91-20.00%) stearic (9,6-17,7%). Unsaturated FA showed a preference for the internal position. Linoleic and oleic acids occurred predominantly in the sn-2 position as generally found in vegetable oils. The main TAGs were triunsaturated GU₃ and monosaturated GSU₂ as majorities' compounds. The tocopherol content of the oils ranged from 7.7 to 31.9mg/kg of oil for α -tocopherol, from 39.3 to 155.1mg/kg for (β + γ)-tocopherol, and from 39.0 to 103.0mg/kg for δ -tocopherol. Quantitative analysis of proteins extracts gave contents ranging from 20.427 and 57.225 g per 100 g of meal. While, the amounts of polyphenols compounds are varied from 19.80 to 46.39 mg Gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of meal.

The data of antioxidant capacities determined by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and phosphomolybdenum (PPM) complex methods, show that the level of the antioxidant activity by two used assays was significantly compared to synthetic antioxidants. Also, it was demonstrated for the first time that the studied oils and seeds extracts possessed a good antioxidant activity which may be associated with their alleged health benefits.

Key words: Pumpkin seed oil, fatty acids (FA), tocopherols, proteins, polyphenols, antioxidant activity.

Figure I.1	: Quelques fruits de certaines cucurbitacées	04
Figure I.2	: Principaux constituants des lipides	08
Figure I.3	: Structure des acides gras	08
Figure I.4	: Structure des monoglycérides	11
Figure I.5	: Structure des diglycérides	12
Figure I.6	: Structure des triglycérides	12
Figure I.7	: Structure des différents tocophérols et tocotriénols	15
Figure I.8	: Structure de Stérols	16
Figure I.9	: Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff. I : EtMgBr ; II : C.C.M; III : dichlorophosphate de phényle, pyridine ; IV: phospholipase A ₂ ; V : lipase pancréatique du porc	26
Figure I.10	: Différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG	26
Figure I.11	: Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les huiles végétales	27
Figure I.12	: Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses animales	27
Figure I.13	: Différents isomères de position d'un TAG ABC	28
Figure I.14	: Structure générale des protéines	31
Figure I.15	: Squelette de base des flavonoïdes	35
Figure II.1.	: Photos des graines de huit échantillons étudiées de citrouille (<i>Cucurbita pepo</i>)	41
Figure II.2	: Action de la lipase pancréatique sur les triglycérides	45
Figure II.3	: Complexe de biuret	49
Figure II.4	: Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du DPPH	52
Figure II.5	: Réduction du radical libre DPPH [•]	52
Figure II.6	: Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du PPM	53
Figure III.1	: CCM de l'huile brute (à gauche) et fraction des TAG à droite, révélée avec l'iode	61
Figure III.2	: Composition glycéridique pour la distribution positionnelle (GUNSTONE)	64
Figure III.3	: Courbe d'étalonnage du cholestérol	66
Figure.III.4	: Courbe d'étalonnage de la vitamine E	68

Figure III.5	: Courbes d'étalonnages de l' α -tocophérol (a) , (β + γ)-tocophérols (b) et δ -tocophérol (c)	69
Figure III.6	: Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) de la composition triglycéridique	71
Figure III.7	: Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) de la composition tocophérolique	72
Figure III.8	: Courbe d'étalonnage de l'albumine (méthode de Biuret)	73
Figure III. 9	: Courbe d'étalonnage de l'albumine (méthode de Lowry)	74
Figure III.10	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	78
Figure III.11	: Courbe d'étalonnage de la catéchine	78
Figure III.12	: Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (Système : MeOH/eau)	80
Figure III.13	: Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (Système : Acétone/Eau)	82
Figure III.14	: Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH	84
Figure III.15	: Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits en albumine dans le test du DPPH	87
Figure III.16	: Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits en Globuline dans le test du DPPH	88
Figure III.17	: Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques (Système : MeOH/Eau) dans le test du DPPH	92
Figure III.18	: Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques (Système : Acétone/Eau) dans le test du DPPH	93
Figure III.19	: Courbe de variation des valeurs d'EC ₅₀ du test du DPPH en fonction du rendement d'extraction (Système : Acétone/Eau)	96
Figure III.20	: Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du PPM	98
Figure III.21	: Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits en albumine dans le test du PPM	101
Figure III.22	: Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits en globuline dans le test du PPM	102
Figure III.23	: Courbes représentant la variation des pourcentages réducteurs en fonction des concentrations des extraits phénoliques (Système : MeOH/Eau) dans le test du PPM	105

Figure III.24	: Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits phénoliques (système : Acétone/Eau) dans le test du PPM	106
Figure III.25	: Comparaison des valeurs d'EC ₅₀ des extraits phénoliques (Système : MeOH /Eau) et standards dans le test du PPM	108
Figure III.26	: Corrélation entre le test du DPPH et le test du PPM (Système : MeOH/Eau)	109
Figure III.27	: Variation des teneurs en flavonoïdes (Système : Acétone/eau) en fonction des valeurs d'EC ₅₀ dans le test du PPM	112
Figure III.28	: Variation des teneurs en flavonoïdes (Système : Acétone/Eau) en fonction des valeurs d'EC ₅₀ dans le test du PPM	112

Tableau I.1	: Description botanique et utilisation de la citrouille (<i>cucurbita pepo</i>)	5
Tableau I.2	: Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales	14
Tableau I.3	: Analyses élémentaires des protéines	33
Tableau I.4	: Principales classes de composés phénoliques	35
Tableau I.5	: Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme	37
Tableau I.6	: Les principales espèces oxygénées réactives	39
Tableau III.1	: Constantes physico-chimiques et teneur des huiles de graines de citrouille	56
Tableau III.2	: Composition relative en acides gras de l'huile de graines de citrouille	59
Tableau III.3	: Composition relative des AG dans les TAG _s et en position Sn-2 (récoltes 2008 et 2009)	62
Tableau III.4	: Les quatre catégories des triglycérides	65
Tableau III.5	: Quantité des stérols dans les huiles de graines de citrouille	67
Tableau III.6	: Quantité des tocophérols dans les huiles de graines de citrouille	68
Tableau III.7	: Composition en tocophérols individuels dans les huiles de graines de citrouille	70
Tableau III.8	: Les teneurs des protéines dans les différents extraits (méthode de Biuret)	73
Tableau III.9	: Les teneurs des protéines dans les différents extraits (méthode de Lowry)	75
Tableau III.10	: Etat physique et rendement d'extraction des extraits phénoliques	76
Tableau III.11	: Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différentes graines étudiées	78
Tableau III.12	: Les valeurs de l'EC ₅₀ des différents extraits lipidiques dans le test du DPPH	85
Tableau III.13	: Les valeurs d'EC ₅₀ des différents extraits d'Albumine et de Globuline dans le test du DPPH	89
Tableau III.14	: Les valeurs d'EC ₅₀ et du TAC des différents extraits phénoliques dans le test du DPPH	94
Tableau III.15	: Les valeurs de l'EC ₅₀ des différents extraits lipidiques dans le test du PPM	99
Tableau III.16	: Les valeurs d'EC ₅₀ des différents extraits d'Albumine et de Globuline dans le test du PPM	103
Tableau III.17	: Les valeurs d'EC ₅₀ et du TAC des différents extraits phénoliques dans le test du PPM	107

AAO	: Activité antioxydante
AFNOR	: Association Française de Normalisation
AG	: Acide gras
AGI	: Acide gras insaturé
AGL	: Acide gras libre
AGPI	: Acide gras polyinsaturé
AGS	: Acide gras saturé
BHA	: 3, tertio-butyl-4, hydroxyanisole
BHT	: 3,5, dio-tertio-butyl-4, hydroxyanisole
CAH	: Classification ascendante hiérarchique
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CE	: Catechin Equivalent
CLHP	: Chromatographie liquide de haute performance
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse.
DAG	: Diacylglycérol (Diglycéride)
DPPH	: Diphényl-2,2 picryl-1 hydrazine
EC ₅₀	: Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres (Efficience concentration).
EMAG	: Ester méthylique d'acide gras.
EOR	: Espèces oxygénées réactives
FID	: Détecteur à ionisation de flamme
GAE	: Acide Gallique Equivalent.
I.A	: Indice d'acide
I.S	: Indice de saponification
IC ₅₀	: Concentration Inhibitrice pour réduire 50% des radicaux libres (Inhibitor concentration).
LDL	: Liporotéines de basse densité (Low Density Lipoproteins)
MAG	: Monoacylglycérol (Monoglycéride)
Mo	: Molybdène
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PI	: Pourcentage d'inhibition
PPM	: Phosphomolybdate
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
TAC	: Capacité antioxydante totale (Total Antioxidant Capacity)
TAG (TG)	: Triacylglycérol (Triglyceride)
TAGI	: Total Acides Gras Insaturés
TAGS	: Total Acides Gras Saturés

Introduction Générale	1
 Chapitre -I- Synthèse bibliographique 	
I.1. Généralités sur les cucurbitacées	4
I.1.1. Classification des cucurbitacées	4
I.1.2. Généralités sur les <i>Cucurbita pepo</i>	5
I.2. Les lipides	6
I.2.1. Définition et structure des lipides	7
I.2.1.1. Lipides saponifiables	8
I.2.1.1.1. Acides gras	8
I.2.1.1.2. Les lipides simples (homolipides)	11
I.2.1.1.3. Les lipides complexes (hétérolipides)	13
I.2.1.2. Lipides insaponifiables (polyisopréniques)	14
I.2.1.2.1. Les tocophérols	14
I.2.1.2.2. Les stérols	15
I.2.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des lipides	16
I.2.2.1. Propriétés des acides gras	17
I.2.2.2. Propriétés des glycérides	18
I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques des tocophérols	19
I.2.2.4. Propriétés physico-chimiques et biologiques des stérols	20
I.2.3. Analyse chimique des lipides	20
I.2.3.1. Caractéristiques physico-chimiques	20
I.2.3.2. Analyse des acides gras	22
I.2.3.3. Analyse des triglycérides	23
I.2.3.4. Détermination de la teneur de la fraction insaponifiable	29

I.2.3.5. Analyse des tocophérols	29
I.2.3.6. Analyse des Stérols	30
I.3. Les protéines	30
I.3.1. Définition	30
I.3.2. Structure chimique des protéines	31
I.3.2.1. Structure primaire	31
I.3.2.2. Structure secondaire	32
I.3.2.3. Structure tertiaire	32
I.3.2.4. Structure quaternaire	32
I.3.3. Propriétés chimiques des protéines	32
I.3.4. Rôle des protéines	33
I.3.5. Dosage des protéines	33
I.4. Composés Phénoliques	34
I.4.1. Présentation générale des polyphénols	34
I.4.2. Classification des polyphénols	34
I.4.3. Propriétés biologiques des composés phénoliques	36
I.4.4. Analyse des polyphénols	38
I.5. Activité antioxydante	38
I.5.1. Espèces oxygénées réactives-stress oxydant	39
I.5.2. Les antioxydants	40
I.5.2.1. Les antioxydants de synthèse	40
I.5.2.2. Antioxydants naturels	40

Chapitre -II- Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes	41
II.1. Matériels	41

II.1.1. Matériel végétal	41
II.1.2. Produits chimiques	42
II.2. Méthodes	42
II.2.1. Extraction et analyse des lipides	42
II.2.1.a. Extraction des lipides	42
II.2.1.b. Détermination des indices physicochimiques	42
II.2.1.c. Préparation et analyse des EMAGs dans l'huile	43
II.2.1.d. Analyse des EMAGs dans les Triacylglycerols (TAGs) purifiés	44
II.2.1.e. Analyse des acides gras en position 2	45
II.2.1.f. Dosage des Stérols par UV-visible	46
II.2.1.g. Analyse des Tocophérols	47
II.2.1.h. Classification ascendante et hiérarchique (CAH)	47
II.2.2. Extraction et dosage des protéines	47
II.2.2.1. Extraction des protéines	47
II.2.2.2. Dosage des composés protéiques	48
II.2.3. Extraction et dosage des polyphénols	50
II.2.3.1. Extraction des polyphénols	50
II.2.3.2. Quantification des composées phénoliques	50
II.2.3.2.a. Dosage des phénols totaux	50
II.2.3.2.b. Dosage des flavonoïdes	51
II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	51
II.2.4.1. Test de DPPH	52
II.2.4.2. Test du phosphomolybdate (PPM)	53

Chapitre -III- Résultats et Discussion

III.1. Extraction et analyse des lipides	55
III.1.1. Teneur et caractéristiques physico-chimiques des lipides	55

III.1.2. Analyse des acides gras dans l'huile	58
III.1.3. Analyse des acides gras en TAGs et en 2-MAGs	60
III.1.4. Analyse des Stérols	66
III.1.5. Analyse des Tocophérols	67
III.1.6. Classification ascendante et hiérarchique (CAH)	71
III.2. Extraction et quantification des composés protéiques	73
III.2.1. Méthode de biuret	73
III.2.2. Méthode de Lowry	74
III.3. Quantification des composés phénoliques	76
III.4. Evaluation de l'activité antioxydante	83
III.4.1. Test de DPPH	83
III.4.1.1. Test de DPPH des lipides	83
III.4.1.2. Test de DPPH des protéines	87
III.4.1.3. Test de DPPH des polyphénols	91
III.4.2. Test du phosphomolybdate (PPM)	97
III.4.2.1. Test du phosphomolybdate des lipides	97
III.4.2.2. Test du phosphomolybdate des protéines	100
III.4.2.3. Test du phosphomolybdate des polyphénols	105
 Conclusion générale	 115
Références bibliographiques	119
Annexe 1	136
Annexe 2	152

Introduction Générale

Les cucurbitacées ont été cultivées pendant longtemps non seulement pour la nutrition mais aussi pour leurs propriétés médicinales. Particulières propriétés médicales ont été attribuées à chaque partie du fruit et les graines de plantes (Maznah et al., 2010). Cependant, les cucurbitacées sont classées en plusieurs espèces selon leurs structures et de leurs pédoncules. Les citrouilles (*Cucurbita*) qui ressortissent de cette famille, comprennent quatre sous-espèces en l'occurrence, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* et *Cucurbita maxima*. La citrouille est probablement originaire d'Amérique du nord, et elle est maintenant cultivée partout (Murkovic et al., 2002 ; Castilho Garcia et al., 2007).

En Algérie, la citrouille locale (*Cucurbita pepo*) a été largement cultivée dans plusieurs grandes régions productrices pendant de nombreuses décennies et peut être considérée comme l'une des principales cultures de légumes. Dans la littérature, il existe de nombreux rapports sur la composition et les propriétés des graines de citrouille et *Cucurbita pepo* en particulier (Younis., 2000 ; El-Adawy et Taha., 2001 ; Stevenson et al., 2007 ; Bagepalli et al., 2010), qui concernent principalement des variétés non-spécifiques. Cependant, peu d'études sur la composition chimique (acides gras, triglycérides, protéines, carbohydrates et phénols, éléments minéraux et autres), les propriétés antioxydantes et les avantages pour la santé de graines de citrouille algériennes.

Les graines de *Cucurbita pepo* et leur huile ont fait l'objet de plusieurs études dans le domaine de santé. La citrouille se présente sous une forme ronde et de couleur orangée. (Murkovic et al., 2002 ; Castilho Garcia et al., 2007).

Récemment, une attention accrue a été portée sur l'utilisation de sous produits agricoles, ainsi que les co- produits et des déchets provenant de la transformation des aliments pour produire des aliments et nutrition (Compaoré et al., 2011). Les graines de *Cucurbita pepo* qui restent en grande quantité en tant que produit résiduel après l'élimination de la chair pouvait être utilisé (Alfawaz., 2004; Siger et al., 2008).

Les graines de citrouille sont consommées directement pour la consommation humaine comme un casse-croûte dans de nombreuses cultures à travers le monde, et les graines sont particulièrement populaires dans les pays arabes, après le salage et la torréfaction. Les graines de *Cucurbita pepo* ont été utilisées comme additifs à certains plats de nourriture (Alfawaz., 2004; Attarde et al., 2010). Les graines de citrouille ont un effet thérapeutique fort qui peut aider à éliminer les parasites intestinaux, nettoyage des vaisseaux sanguins, de normaliser le taux de cholestérol et de stimuler l'activité rénale (Gemrot et al., 2006 ; Umadevi et al., 2011). Bien que les graines de citrouille sont riches en huile et en protéines, la récolte pourrait potentiellement devenir une autre source d'huile végétale

et de protéines, des études détaillées sur leur composition et les propriétés de leur huile sont limitées (ALfawaz., 2004; Evangelos., 1992). Les graines, et tout particulièrement leurs germes, contiennent jusqu'à 35% d'huile, des protides riches en acides aminés essentiels et la cucurbitacine. Elles sont également riches en zinc et en autres éléments qui préviennent de la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone (Bachmann et Adam., 2010 ; Attarde et al., 2010 ; Caili et al., 2006).

Selon une étude chinoise publiée en 2007 (Caili et al., 2006), l'ingestion d'extraits de citrouille pourrait permettre aux diabétiques de types I de ne plus avoir à s'injecter de l'insuline chaque jour. Egalement, les graines de citrouille vertes ont d'excellentes propriétés diurétiques et sont d'une bonne aide aux personnes souffrant de problèmes liés à la prostate ou à une miction difficile (Huang., et al., 2004 ; Murkovic et al., 2002 ; Castilho Garcia et al., 2007). La consommation des graines de *Cucurbita pepo* particulièrement est indiquée pour leur effet vermifuge et laxatif (Murkovic et al., 2002 ; Castilho Garcia, et al., 2007). Certaines études épidémiologiques ont démontré un lien entre la consommation de citrouille et la diminution du risque de certains types de cancers. D'abord, des chercheurs ont observé que les gens qui consommaient davantage de citrouille avaient un moindre risque de différents types de cancers (Kune et al., 1992 ; Matsuo. et al., 2001).

Les composés protéiques font l'objet de nombreuses recherches orientées en particulier sur la connaissance de leur structure, leur rôle nutritionnel. De nombreuses études ont montré que les protéines possèdent un rôle structural et fonctionnel et de réserve « il n'y a pas de vie sans eau mais non plus sans protéine », du point de vue qualitatif les protéines participent à tout l'événement physiologique. Ils jouent un rôle essentiel dans les fonctionnements des cellules vivantes. Les protéines sont des biopolymères appelés polypeptides d'acide amine de la série L (Lusas., 1979). Toutefois, les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Lopes-Lutz et al., 2010).

La présente étude est consacrée à la valorisation de quelques graines du fruit de la famille des cucurbitacées (graines de citrouille). Cette valorisation consiste à déterminer la composition des lipides en acides gras, en triglycérides, en tocophérols, ainsi d'évaluer les tourteaux de ces graines en dosant les teneurs en protéiques et phénols totaux et leurs activités antioxydantes. Cette étude a été entreprise pour les raisons suivantes :

- La production importante de cette espèce en Algérie et notamment dans les régions steppiques et sahariennes.

- Les graines de cette espèce ont toujours été considérées comme des déchets malgré leur grande importance, car elles sont riches en lipides, protéines, glucides.
- L'importance commerciale de ces plantes fruitières (citrouille) en Algérie en alimentation humaine.
- Actuellement les huiles des graines de citrouille sont disponibles et vendues au niveau des herboristes pour leur utilisation en médecine traditionnelle.
- Il a été constaté qu'un certain nombre de composés extraits de cette famille de plante présente des propriétés curatives ; l'huile de pépins de courge est utilisée contre l'hyper-cholestérolémie, et également efficace contre les caries dentaires et les infections de la bouche (aphtes, fissures labiale). Sa teneur en acides gras essentiels (les acides oléique et linoléique) permet de réguler la présence des acides gras insaturés, elle possède également des propriétés vermifuges et prodigue un effet apaisant et cicatrisant sur l'appareil digestif. Elle stimule et tonifie le système nerveux et cardio-vasculaire.
- Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des constituants chimiques des graines des cucurbitacées et à notre connaissance aucun travail n'a été publié sur les lipides de la citrouille locale (*cucurbita pepo*) et notamment la distribution des acides gras entre les trois positions du glycérol.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à donner quelques connaissances bibliographiques concernant les graines de citrouille locale (Calebasse), des généralités (structures et propriétés) sur les composés lipidiques, protéiques et phénoliques ainsi un aperçu sur l'activité antioxydante. Par la suite, notre étude a été consacrée à l'étude des lipides de huit échantillons de graines de citrouille à travers la détermination des compositions chimiques en acides gras, en triglycérides, en tocophérols. Ensuite, nous avons quantifié les composés protéiques (en Albumine, en Prolamine et en Globuline) et phénoliques des différents extraits préparés des huit échantillons choisis. Enfin, nous avons évalué le pouvoir antioxydant des extraits lipidiques, protéiques et phénoliques par l'étude de leur capacité à balayer le radical stable DPPH[•] et à réduire le molybdate (VI) au molybdate (V).

.

Chapitre -I-

Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les cucurbitacées

Cette famille végétale offre une incroyable diversité de fruits : la volupté de leur forme, la couleur de leur peau, la multiplicité de leurs usages expliquent que les cucurbitacées comptent parmi les plantes les plus connues et les plus cultivées au monde.

Apparues très tôt sur le continent américain (vers 6 000 av. J.-C.), elles ont eu un rôle majeur dans le développement de l'agriculture naissante en Amérique, d'où leur culture s'est propagée à tous les continents. Un peu partout sur le globe, les cucurbitacées sont aujourd'hui consommées (melon, pastèque, courgette), utilisées comme objets du quotidien (gourde) ou comme médicament (margose) (Blanchard., 1981 ; Prades *et al.*, 1998 ; Bérard *et al.*, 2000).

I.1.1. Classification des cucurbitacées

Dans la grande famille des Cucurbitacées, les botanistes ont identifié environ 130 genres différents, eux-mêmes divisés en 800 espèces environ (Prades *et al.*, 1995). Parmi eux on distingue le genre *cucurbita* (Figure I.1). Ce genre comprend treize espèces, dont cinq sont cultivées pour l'alimentation :

- *Cucurbita ficifolia* : par exemple la courge de siam
- *Cucurbita maxima* : communément appelée potiron
- *Cucurbita mixta* : communément appelée la courge mexicaine
- *Cucurbita moschata* : communément appelée courge musquées ou muscades
- *Cucurbita pepo* : communément appelée citrouille



Figure I.1. Quelques fruits de certaines cucurbitacées

I.1.2. Généralités sur les *Cucurbita pepo*

Le terme « citrouille » est d'abord apparu dans la langue en 1256 sous la forme de « citrole », pour prendre sa graphie actuelle en 1549. Il vient de l'italien citruolo, qui l'a emprunté au latin citrus, « citron ». La citrouille est une plante annuelle appartenant au genre *Cucurbita* et à la famille des Cucurbitacées. C'est aussi le nom de son fruit volumineux. La citrouille est de forme "ronde". Son pédoncule est dur et fibreux, avec 5 côtés anguleux, sans renflements à son point d'attache. Sa chair est filandreuse (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Description botanique et utilisation de la citrouille (*cucurbita pepo*)

Description de la plante, du fruit et de graines	Photo
<u>Nom de la plante</u> Nom vernaculaire : Calebasse Nom français : citrouille Nom latin : <i>cucurbita pepo</i> famille : cucurbitacée Nom arabe : اليقطين <u>Caractères</u> Couleur des graines : jaune Forme des feuilles : triangulaire très lobée Type de pilosités : épineux (rugosité) Aspect de sépale : fines Aspect de l'épiderme de fruit : brillant Forme du pédoncule du fruit : anguleux (5 angles) <u>Utilisation</u> Les graines de citrouille sont utilisées comme diurétique, contre les parasites du système digestif, pour traiter la fièvre et les désordres gastro-intestinaux ainsi que les troubles du système urinaire, l'énurésie et l'irritation de la vessie (Musset et Grange., 2000).	  

Les nutriments les plus importants que renferme la citrouille sont : les vitamines A, B₂, C et E ; l'acide pantothénique et les oligo-éléments (Phosphore, Magnésium, Potassium, Fer, Zinc, Manganèse et Cuivre) (Attarde. et al., 2010).

Les graines de *Cucurbita pepo* contiennent une quantité élevée de phytostérols. Ces composés sont reconnus pour leurs bienfaits sur la santé cardiovasculaire (Phillips et al., 2005) et leurs effets potentiellement bénéfiques dans la prévention de certains cancers (Awad et Fink., 2000; Berges et al., 1995). De plus, les acides gras des graines de citrouille sont, dans une grande proportion, monoinsaturés et polyinsaturés, des types de lipides ayant des effets bénéfiques contre les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (Bazzano., 2003 ; Lampe., 1999 ; Hu et Willet., 2002). Les graines de *Cucurbita pepo* pourraient également être utiles pour soulager les symptômes de la vessie irritable (ou vessie hyperactive) et les troubles de la miction associés à l'hypertrophie bénigne de la prostate (Dvorkin et Song., 2002).

C'est en Autriche qu'en 1735, on aurait pour la première fois exprimé l'huile des graines de *Cucurbita pepo* d'une variété locale (styriaca), dont la chair est insipide. Elle a d'abord été employée dans les baumes et les crèmes pour ses propriétés médicinales. Elle est ensuite passée dans l'alimentation. Des chercheurs ont découvert son action favorable sur la prostate. Ils se sont penchés sur la composition de cette huile dans le but de comprendre le mécanisme de cette action (Musset et Grange., 2000 ; Stahl et Sies., 2005 ; Van Het Hof et al., 2000).

Depuis quelques années, certaines études épidémiologiques et de cas-contrôle ont démontré un lien entre la consommation de citrouille et le risque de certains types de cancers. D'abord, des chercheurs ont observé que les gens qui consommaient davantage de citrouille avaient un moindre risque de différents types de cancers (Huang et al., 2004 ; Kune et al., 1992 ; Matsuo et al., 2001).

I.2. Les lipides

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a utilisé les corps gras pour leurs différentes propriétés, notamment en nutrition, en cosmétologie et en médecine. De nombreux textes anciens font ainsi références à diverses huiles de graines ou à des graisses animales (Yousfi., 2005).

Les lipides sont largement répandus dans l'environnement, ce sont des produits complexes dont les différents constituants jouent de façon directe ou indirecte, immédiate ou retardée, un rôle énergétique, structural et fonctionnel (Carpentier., 1996; Chos et Riche., 2005).

I.2.1. Définition et structure des lipides

Du grec "*lipos*" graisse c'est une classe des molécules biologiques hydrophobes constituées par des acides gras aliphatiques et leurs esters à nombre égal ou supérieur à quatre atomes de carbone et d'autres constituants mineurs. La fraction lipidique totale d'un tissu végétal ou animal est l'ensemble des composés organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants apolaires (Frènot et Vierling., 2001).

Elles comprennent deux catégories essentielles :

- Lipides de réserve, constitués des triacylglycérols (TAG) nommés aussi triglycérides, constituants largement majoritaires, ainsi que de composés métaboliquement proches, les monoacylglycérols (MAG) et les diacylglycérols (DAG), les lipides constituent ainsi une réserve énergétique mobilisable (1g de lipides donne environ 9,3 Kcal) (Lagarde., 2003; Chos et Riche., 2005).
- Lipides de constitution (structure), représentés par les phospholipides. Les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organelles. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité) (Carpentier., 1996).

Lors de la saponification d'une huile végétale par un hydroxyde alcalin, on obtient deux fractions :

- Une fraction majoritaire constituée de sels d'acides gras résultant de l'hydrolyse des TAG, des DAG, des MAG, des phospholipides et des glycolipides. Cette fraction appelée saponifiable est soluble dans l'eau (Figure I.2).
- Une fraction minoritaire constituée de divers composés, tels que les triterpènes, les vitamines liposolubles (A, D, E et K), les alcools gras, les hydrocarbures des carotènes (pigments jaunes) et des caroténoïdes, les stérols et les tocophérols. Cette fraction appelée insaponifiable est soluble dans presque tous les solvants organiques non polaires (Figure I.2).

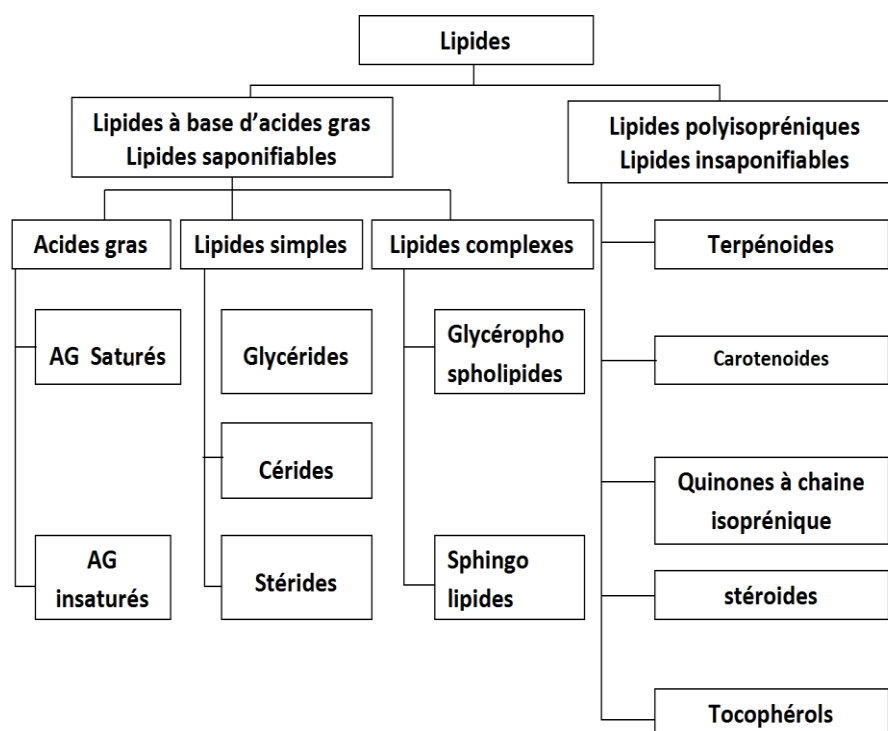


Figure I.2. Principaux constituants des lipides

I.2.1.1. Lipides saponifiables

Des lipides qui sont traités par des bases minérales (NaOH, KOH) donnent du savon.

I.2.1.1.1. Acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques aliphatiques hydrophobes à chaîne carbonée plus ou moins longue dérivant de/ou contenu dans les graisses animales et végétales (Figure I.3). Par extension, le terme est parfois utilisé pour désigner tous les acides carboxyliques à chaîne carbonée non cyclique (Fahy *et al.*, 2005). Les acides gras (AG) n'existent pratiquement pas à l'état libre dans les cellules et les tissus, mais le plus souvent estérifiés à des alcools tel que le glycérol....

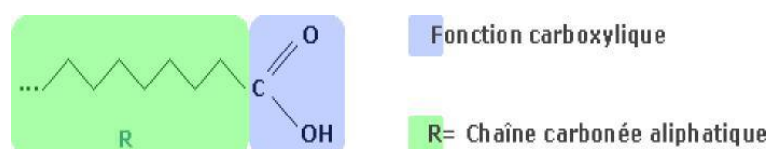


Figure I.3. Structure des acides gras

Les acides gras ont généralement un goût aigre et une odeur prononcée. Ils sont insolubles dans l'eau, mais solubles entre eux et dans les solvants organiques comme l'éther. Ils se diffèrent

entre eux par la longueur de la chaîne carbonée (de 4 à 30 atomes de carbone pour les acides gras les plus connus, généralement un nombre paire) (Veillet., 2010).

Par le type de liaisons qui réunissent leurs atomes de carbone : on dit qu'ils sont saturés lorsqu'ils ne contiennent que de simples liaisons, et insaturés lorsqu'ils comptent au moins une double liaison (Blond., 1993). On observe une prédominance très marquée des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal (Yousfi., 2005).

On connaît une quarantaine d'acides gras naturels, dont les plus importants sont l'acide butyrique (ou butanoïque), que l'on trouve dans le beurre, l'acide palmitique (huile de palme), l'acide stéarique (suif), l'acide linoléique (huile d'arachide) duquel est dérivé l'acide arachidonique, et l'acide linoléique (huile de bourrache). Les acides linoléique et linoléique sont des acides gras dits essentiels : les animaux sont incapables de les synthétiser et doivent donc obligatoirement les trouver dans leur alimentation. Les deux acides constituent ensemble ce qu'on appelait autrefois la vitamine F (Dymock., 2000).

Les acides gras (AG) diffèrent donc entre eux non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre, la position et la structure spatiale (cis ou trans) des doubles liaisons.

La longueur de la chaîne carbonée permet une classification des AG en quatre catégories:

- AG volatils avec 2,3 ou 4 atomes de carbone.
- AG à chaîne courte qui possède 6 à 10 atomes de carbone
- AG à chaîne moyenne avec 12 à 14 atomes de carbone
- AG à chaîne longue ($\geq$ à 16 atomes de carbone).

Les acides gras de 16 et 18 atomes de carbone sont les plus dominants dans le règne végétal.

Les acides gras sont classés en trois groupes essentiels selon leur structure chimique :

➤ **Acides gras saturés**

Ils sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée sans double liaison. En fait, cette chaîne n'est pas "linéaire" car les angles de valence entre les carbones sont autour de 109° . Les acides gras à courte chaîne sont liquides à température ambiante alors que les acides gras pourvus de 10 atomes de carbone sont solides. Leur formule générale est $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$. Ils peuvent également être exprimés par le symbole **Cx:0**, où

C_x indique le nombre d'atomes de carbone ;

0 indique qu'il y a zéro double liaison carbone-carbone et par conséquent, que l'acide gras est saturé.

➤ Acides gras insaturés

Les acides gras insaturés peuvent contenir entre 1 et 6 doubles liaisons et sont dits selon le cas monoinsaturés ou polyinsaturés. La présence de la double liaison introduit une possibilité d'isomérisation : Cis ou Trans dans la molécule. Dans les acides gras insaturés naturels, les doubles liaisons sont en configuration isomérique Cis.

La formule générale d'un acide gras insaturé est : C_nH_(2n-x)O₂ (n = nombre d'atome de carbone et x = nombre d'insaturations). Les acides gras à 1 double liaison sont dits mono éthyléniques tandis que les acides gras à plusieurs doubles liaisons sont dits poly éthyléniques. Les doubles liaisons sont notées Δ.

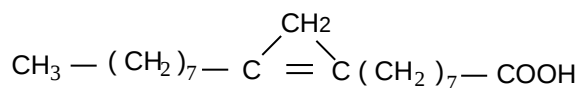
C_n : x Δ^{a, b, c} avec :

n = nombre de Carbone ; x = nombre de doubles liaisons ; a, b et c = positions des doubles liaisons.

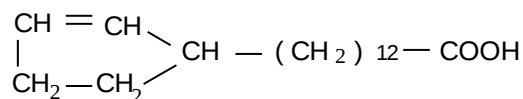
Exemple : acide dihomog γ linoléique (C₁₈:3 Δ^{8, 11, 14}).

➤ Acides gras cycliques

Sont rarement rencontrés, ils consistent :



Acide sterculiques : 8-(2-Octyl cyclopropén1yl) octanoïque



Acide chaulmoogrique : 13-(Cyclopent-2-enyl) tridécanoïque

I.2.1.1.2. Les lipides simples (homolipides)

Composés uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont souvent des esters d'un alcool et d'acides gras (Acides gras + Alcool). Les lipides simples sont classés en trois groupes : les glycérides, les cérides et les stérides (Léger., 2010).

❖ Les glycérides (triacylglycérols)

Les corps gras ne sont pas constitués par les mélanges des acides gras mais par des mélanges de triesters (entre les acides gras et le glycérol). Les glycérides sont donc des esters du glycérol et des acides gras.

Ils sont présents dans la quasi-totalité des tissus de tous les êtres vivants. Les triglycérides constituant la principale forme de stockage des lipides (Horpkins., 2003). Les triglycérides sont les constituants principaux des huiles végétales (plus de 95%). Les monoglycérides et les diglycérides sont beaucoup moins abondants que les triglycérides (Bereau., 2001).

Selon le nombre d'acides Gras liés au glycérol, on distingue les **mono-**, les **di-** et les **triglycérides** :

a. Les monoglycérides

Résultant de l'estérification d'une molécule de glycérol par une seule molécule d'acide gras, ils existent sous deux formes isomères de position selon que la chaîne grasse est portée par une des fonctions alcool primaires ou par la fonction alcool secondaire (mono glycéride 2) (Figure I.4)

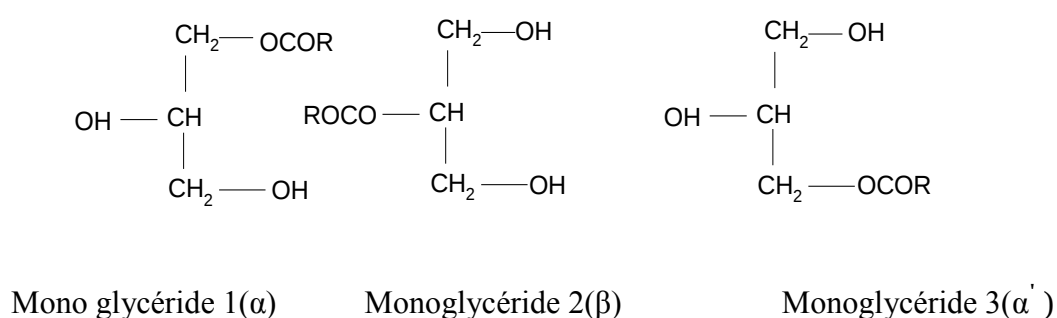


Figure I.4. Structure des monoglycérides

b. Diglycérides :

Résultant de l'estérification d'une molécule de glycérol par deux molécules d'un même acide gras : (diglyceride 1.3), (diglyceride 1.2) et (diglyceride 2.3) (Figure I.5) (Naudet., 1992).

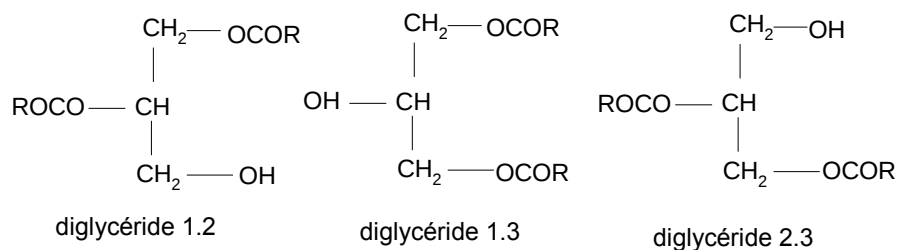


Figure I.5. Structure des diglycérides

c. Triglycérides

Lorsqu'une molécule de glycérol est liée à trois molécules d'acides gras, on obtient les triglycérides. Quand la molécule de glycerol est liée à un même acide gras les triglycérides formés ont dits "homogènes" ou simples. Dans le cas contraire, le triglycéride est dit "mixte." (Figure I.6).

Si la molécule du glycérol est estérifiée par des molécules d'acides gras différents, trois isomères de position, chacun dédouble en deux stéréo-isoméries, sont possibles (Naudet., 1992).

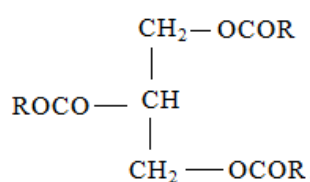


Figure I.6. Structure des triglycérides

- ❖ **Les cérides:** Les cérides sont des esters d'acide gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne qui sont en général des alcools primaires, à nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés (Bereau., 2001).

Céride = acide gras + alcool à long chaîne

- ❖ **Les stérides:** Les stérides ou esters de stérol sont un groupe hétérogène de composés chimiques, créés par l'estérification entre le groupe hydroxyle d'un stérol et un AG (Charpentier et

al., 2008 ; Charles et *al.*, 2003).

Stéride = acide gras + stérol

les stérides réduisent les niveaux de lipoprotéines de basse densité (LDL) du cholestérol dans le sang (Katan et *al.*, 2003).

I.2.1.1.3. Les lipides complexes (hétérolipides)

Les lipides complexes (parfois appelés hétérolipides) sont des lipides qui contiennent en plus du carbone, l'hydrogène et l'oxygène un ou plusieurs hétéroatomes (azote, phosphore, soufre). Suivant la nature de l'hétéroatome, on distingue : les lipides phosphorés (glycérophospholipide), les lipides azotés (sphingolipide) et les lipides Soufrés. Ces lipides polaires constituent une fraction mineure dans les huiles végétales, les plus répandus sont les glycérophospholipides et les sphingolipides.

- **Glycérophospholipides** : Les glycérophospholipides, encore appelés phospholipides ou phosphoglycérides, résultent de l'association d'acide gras et d'acide phosphatidique (Charpentier et *al.*, 2008). L'acide phosphatidique est l'élément de base des glycérophospholipides

Glycérophospholipide = acide gras + acide phosphatique

Acide phosphatidique = Glycérol + 2 Acides Gras + H_3PO_4 (acide phosphorique)

- **Les sphingolipides** : Dans ce groupe, le glycérol est remplacé par un alcool aminé la sphingosine (Charpentier et *al.*, 2008) :

Sphingolipide = acide gras + sphingosine

L'acide gras est fixé à la sphingosine par une liaison amide (liaison du carboxyle de l'AG sur le $-NH_2$ de la sphingosine) (Moussard., 2004).

I.2.1.2. Lipides insaponifiables (polyisopréniques)

La fraction insaponifiable ou partie non glycéridique est par définition l'ensemble des constituants d'une huile ou d'une graisse qui, après action d'un hydroxyde alcalin (saponification), sont solubles dans les solvants classiques des lipides (solvants apolaires ou peu polaires). Après saponification de l'huile, l'insaponifiable est extrait par l'éther diéthylique.

L'étude de la fraction insaponifiable est complexe du fait de la diversité de ses constituants d'une part, et de la faible quantité de matériel de départ disponible d'autre part. En effet, contrairement aux graisses animales, le taux de l'insaponifiable des huiles végétales est relativement faible (0,2 à 2,0 % m/m) (Ucciani, 1995 ; Karleskind, 1992), à l'exception du beurre de karité qui présente une teneur en insaponifiable d'environ 10 % (Karleskind, 1992) (Tableau I.2).

Tableau I.2 : Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales (Karleskind, 1992).

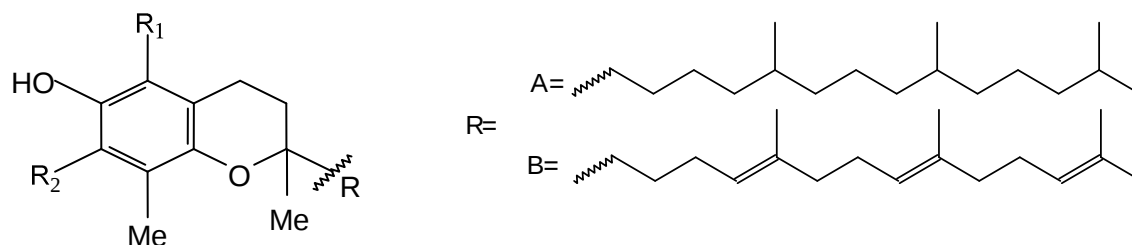
Huile	Teneur en insaponifiable (%m/m)
Tournesol	0,5 – 1,5
Colza	0,7 – 1,8
Soja	0,5 – 1,6
Maïs	0,8 – 2,0
Pépins de raisin	0,8 – 1,5
Carthame	1,0 – 1,5
Sésame	0,5 – 1,5
Oeillette	0,5 – 1,3
Lin	0,3 – 1,2
Amande	0,3 – 1,2
Noisette	0,5 – 0,7
Noix	0,5 – 1,0
Pépin de cassis	1,0 – 1,2
Citrouille	1,2
Courge	2,1
Melon	1,0
Germe de blé	3,0 – 4,0
Arachide Afrique	0,6- 1 0
Arachide Amérique du sud	0,6 – 0,9
Coton	0,6 – 1,5
Coprah	0,6 – 1,5
Palmiste	0,3 – 0,8
Beurre de cacao	0,3 – 0,5
Karité	7,0 – 10,0
Olive vierge	0,4 – 0,8
Palme	0,5 – 1,2
Avocat	1 – 12,0

Les lipides polyisopréniques jouent un rôle biologique fondamental (hormones et vitamines) (Veillet., 2010).

I.2.1.2.1. Les tocophérols

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possédant un noyau chromane portant en carbone 2 une chaîne latérale tri-isopropénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols (Figure I.7). Les tocophérols et tocotriénols représentent une famille très homogène de produits, constitués d'un reste hydroquinone substitué par un ou plusieurs groupes méthyles, et d'une chaîne

polysoprénique plus ou moins saturée, les huit tocophérols et tocotriénols naturels isolés diffèrent entre eux par le nombre et la position relative des méthyles sur le cycle aromatique, mais la chaîne isoprénoïde est identique dans chacune des sous-familles. On les appelle « α , β , γ , δ -tocophérols et tocotriénols» (Chazan et al., 1987).



Composés			
R ₁	R ₂	A	B
CH ₃	CH ₃	α -tocophérol	α -tocotriénol
H	CH ₃	β -tocophérol	β - tocotriénol
CH ₃	H	γ -tocophérol	γ - tocotriénol
H	H	δ -tocophérol	δ - tocotriénol

Figure I.7. Structure des différents tocophérols et tocotriénols

L'activité en vitamine E est la résultante naturelle de 8 molécules dont les structures dérivent de celles des tocophérols et les tocotriénols. Chaque vitamère a une activité vitaminique différente, comparée à celle de l' α -tocophérol qui est considérée comme la forme primaire la plus active que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature (Greenfield et Southgate., 2007).

Les β et γ -tocophérols ont une activité vitaminique réduite, alors que la forme δ est pratiquement inactive. Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (Brigelius-Flohe et Traber., 1999).

I.2.1.2.2. Les stérols

Ce sont des composés tétra cycliques comportant le plus souvent 27 ou 28 et même parfois 29 atomes de carbone, ils diffèrent de leurs précurseurs biosynthétiques.

Le noyau tétra cyclique possède le plus souvent une double liaison localisée fréquemment en position 5, mais que l'on peut rencontrer en position 7 (Figure I.8).

La chaîne latérale possède huit à neuf ou dix atomes de carbone; elle peut être saturée ou comporter en 22,24(25), 24(28) ou 25(27) une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées.

Les stérols constituent une fraction importante de l'insaponifiable (Naudet., 1992). Le stérol le plus abondant dans le règne végétal et sans conteste le sitostérol, suivi du campestérol, du stigmastérol, de l'isofucostérol et dans le règne animal, on trouve le cholestérol.

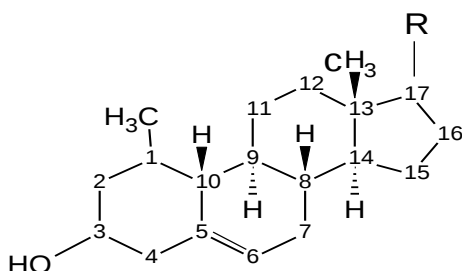


Figure I.8. Structure de Stérols

I.2.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des lipides

Les graisses sont indispensables au corps car, ce sont des composés énergétiques puisque l'oxydation d'un gramme de lipide libère une énergie de 38 kJ. Egalement elles constituent des réserves sous forme de triglycéride (dans les tissus adipeux, sous cutanés), puisque 8 kg de triacylglycérol, réserve habituelle de l'adulte sont équivalent au 40kg de glycogène hydraté.

Les lipides jouent aussi un rôle structural formant une bicouche membranaire, en plus ils possèdent un rôle fonctionnel comme les hormones lipophiles et les prostaglandines. Ils fournissent des vitamines liposolubles comme médiateurs cellulaires.

Dans le sang, les lipides plasmatiques sont sous forme des lipoprotéines, les protéines associés au apolipoprotéines ont à la fois un rôle vecteur et un rôle enzymatique dans le métabolisme lipidique (Frènot et Vierling., 2001). Ils jouent de nombreux rôles dans le monde vivant :

- 1) Réserves intracellulaires d'énergie.
- 2) Matériaux de structure (couches de protection de cellules, composants des membranes biologiques.
- 3) Molécules en concentration faible qui peuvent être des précurseurs d'activité biologique (hormones stéroïdes, médiateurs extracellulaires et messagers intracellulaires, vitamines liposolubles...) et sensibles à des stimuli comme celles des photorecepteurs.

I.2.2.1. Propriétés des acides gras

a). Propriétés physiques :

1. Solubilité

- Les acides gras à courte chaîne carbonée sont solubles dans l'eau, puis la solubilité des acides gras baisse progressivement et ils deviennent insolubles à partir de 10 atomes de carbone.
- Ils sont solubles dans les solvants organiques apolaires comme le : benzène, chloroforme, ... (Frénét et Vierling., 2001).

2. Point de fusion

Il dépend du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne

- Dans les acides gras saturés, le point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonnée.
- Les acides gras insaturés ont un point de fusion inférieur à celui des acides gras saturés à longue chaîne identiques (Frénét et Vierling., 2001).

Une augmentation du nombre d'insaturation entraîne une diminution de la température de fusion. Donc à température ordinaire, tous les acides gras insaturés sont liquides.

b). Propriétés chimiques :

- Les acides gras traités par un hydroxyde métallique alcalin (NaOH, KOH) donnent un sel alcalin d'acide gras ou savon.
- Avec l'alcool, les acides gras donnent des esters. Les principaux alcools sont le glycérol et le cholestérol.
- L'halogénéation par le Br₂ ou l'I₂: acide gras mono insaturés est transformé en un dérivé di halogéné, permettant la détermination de l'indice d'iode (Réaction utilisée pour évaluer le degré d'insaturation).

c). Propriétés biologiques :

Les acides gras jouent un rôle énergétique et de réserve. Parmi les acides gras, on distingue les acides gras essentiels qui sont indispensables au corps humain. Dans le cas de carence en ces acides

se manifeste plusieurs maladies parce que l'homme est incapable de les synthétiser. Parmi les acides gras essentiels, on peut citer :

- ❖ L'acide polyinsaturés (n-6) [AGPI n-6] série linoléique qui possède une fonction reproductrice et fonction cellulaire (favorise la différenciation de l'épiderme) et la régulation des lipides du plasma abaissent le cholestérol LDL athérogène.
- ❖ L'acide polyinsaturé (n-3)[AGPI n-3] série α -linoléique possède une neurosensorielles (fonction spécifique dans le développement de la rétine, du cerveaux et du système nerveux, fonction plaquettaire (les AGPI n-3 sont des antiagrégants plaquettaires) . Les acide gras AGPI n-3 possèdent des fonctions anti-inflammatoire, précurseurs de nombreuse molécules aux fonctions de signalisation inter et intracellulaires impliqués dans les réactions inflammatoires. Ils diminuent la synthèse de cytokine proinflammatoire.

Ces deux types d'acide gras possédant d'autres rôles communs, ils entrant dans la composition des phospholipides membranaires plus la molécule et insaturée à long chaîne plus elle est souple. Autres rôles peuvent être attribués à ce type d'acides gras comme la prévention contre certaines maladies cardiovasculaires (Frènot et Vierling., 2001).

Les autres acides gras se répartissent entre acides gras saturés (AGS) ou acides gras mono insaturés (AGMI), selon leur structure chimique. Une consommation excessive en acides gras saturés (AGS) fait augmenter les taux de Cholestérol total et de lipides sanguins ; elle accroît en outre l'agrégation plaquettaire. Si l'acide stéarique (C18 :0) est de ce point de vue, considéré comme (neutre) puisque il se transforme rapidement par un métabolisme en acide oléique (C18 :1).

Les acides myristique (C14:0) et palmitique (C16:0) plus particulièrement mis en cause dans les facteurs de risques des maladies cardio-vasculaires sont toujours l'objet d'études.

La réduction de leur consommation abaisse donc le cholestérol plasmatique, surtout lorsqu'on, même temps, on augmente la consommation d'acide linoléique, le principal acide gras a effet hypocholestérolémiant.

I.2.2.2. Propriétés des glycérides

a). Propriétés physiques :

La propriété physique dominante est le caractère complètement apolaire des acylglycérols naturels, essentiellement des triacylglycérols. Les groupes polaires (hydroxyle ou carboxyle) disparaissent dans les liaisons esters.

- Le point de fusion des acylglycérols dépend de leur composition en acides gras : il s'élève avec le nombre des acides gras saturés et la longueur de la chaîne, la présence d'acides gras insaturés diminue le point de fusion
- Ils sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants les plus apolaires.

b). Propriétés chimiques :

- Le traitement acide libère les constituants : les acides gras et du glycérol mais en général de façon incomplète.
- La lipase pancréatique hydrolyse les TAG (digestion enzymatique) par étape et ce en émulsion des lipides (sels biliaires présents dans l'intestin) et en présence d'un facteur protéique la colipase. Un TAG est hydrolysé en diglycéride avec libération d'un acide gras et le diglycéride en 2-monoacylglycérol et un acide gras qui sont absorbés par l'intestin.
- La réaction de saponification peut servir à doser la fraction non saponifiable d'un extrait lipidique qui contient les lipides non acides et non esters (hydrocarbures, isoprénoides...).

c). Propriétés biologiques :

- La plupart des eucaryotes stockent ces lipides neutres dans des inclusions huileuses du cytosol : graines de plantes oléagineuses, tissu adipeux des mammifères.
- Le tissu adipeux sous-cutané est un isolant thermique très efficace chez les animaux à sang chaud des régions polaires.

I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques des tocophérols

A la température ambiante, les tocophérols se présentent sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques).

Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de l- α -tocophérol sont relativement stables (Bourgeois., 2003).

Les tocophérols sont au nombre de 4 (α , β , γ et δ -tocophérols). Ils jouent le rôle d'antioxydants naturels ce qui explique pourquoi les huiles végétales résistent bien au phénomène de rancissement. Parmi ces tocophérols, l' α -tocophérol ou vitamine E est doté de l'effet antioxydant le plus puissant.

La vitamine E est un antioxydant majeur au sein des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Elle inhibe le phénomène de peroxydation lipidique en piégeant les radicaux libres générés lors du processus oxydatif. Les propriétés antirides de la vitamine E sont une conséquence de ses propriétés hydratantes. En augmentant la capacité de rétention d'eau de la peau, la vitamine E améliore son aspect de surface et diminue l'amplitude des rides ; la peau devient plus souple et plus douce (Di Mambro *et al*, 2003 ; Sies *et al.*, 1992).

I.2.2.4. Propriétés physico-chimiques et biologiques des stérols

- Propriétés physiques : Les stérols ont un point de fusion oscillant entre 120 et 170 °C augmente généralement avec le nombre d'atome de carbone.
- Propriétés chimiques : Propriétés dues à la fonction alcool (formation des esters) si par exemple les stérols sont souvent unis à des acides gras et réalisent alors la formation ce qu'on appelle des stérides.
- Rôle biologique des stérols : Les stérols jouent un rôle très important dans le corps humain. Ce sont les précurseurs des hormones stéroïdiennes (hormone génitale ou corticosurrénal) et acide biliaires, vitamine D, hétéroside cardiotonique de la digital et du strophanthus, saponine, certaine composante du venin de crapaud. Parmi les stérols le cholestérol joue un rôle important, intervient dans les précurseurs de la vitamine D₃ et les précurseurs des sels biliaires (synthétise par le foie et accumule dans les bile) (Frènot et Vierling., 2001).

I.2.3. Analyse chimique des lipides

I.2.3.1. Caractéristiques physico-chimiques

a- La densité d^T :

Elle est basée sur la mesure de la masse, à une température ambiante, d'un volume de corps gras contenu dans le pycnomètre préalablement étalonné à la même température (T).

$$d^T = (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0)$$

M_0 : la masse en gramme du pycnomètre vide ; M_1 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau ; M_2 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile.

b- Indice de réfraction η^T

Il permet de mesurer le pouvoir réfringent des huiles par rapport à la raie «D» du sodium (589,6 nm) à la température de référence.

c- Indice d'acide (I.A) :

C'est le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser les acides gras libres de un gramme de corps gras. Il consiste en la mise en solution d'une prise d'essai dans un mélange de solvants (n-Butanol- Ethanol 1/1 v/v), puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium.

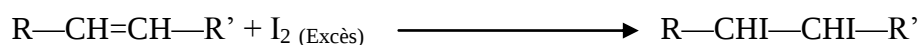
L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$I.A = \frac{V.N.56,1}{m}$$

V : le volume en ml de soude utilisé pour le titrage ; N : normalité de la solution de soude ; m : la masse en gramme de la prise d'essai ; 56,1 : masse molaire de KOH.

d- Indice d'iode :

L'indice d'iode correspond au nombre de grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons de 100 grammes de matière grasse purifiée et séchée. Quel que soit le réactif halogène utilisé, le principe est le même. Les liaisons éthyliques, en particulier celles des acides gras, fixent les halogènes d'après la réaction suivante:



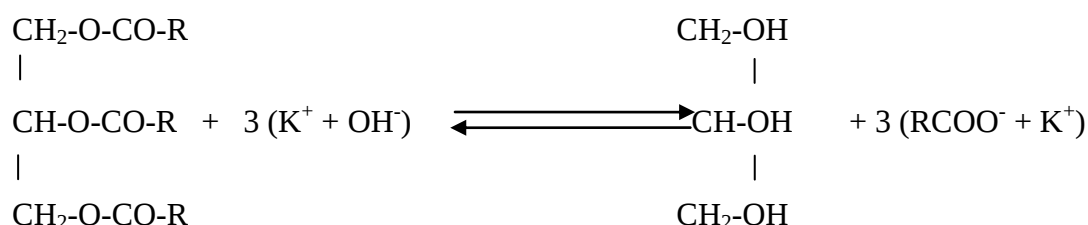
L'indice d'iode est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I.I = \frac{(V_0 - V). C .12,69}{m}$$

V_0 : volume de thiosulfate de sodium dans le test à blanc exprimé en ml ; V : volume de thiosulfate de sodium (en ml) nécessaire pour la neutralisation de l'excès d'iode ; C : concentration molaire de la solution de thiosulfate de sodium ; m : masse prise d'essai d'huile en gramme.

e- Indice de saponification (I.S)

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides de un gramme de corps gras.



La détermination de l'indice de saponification est réalisée en utilisant la norme (AFNOR. NF T60-206) en appliquant la relation suivante:

$$I.S = \frac{N.(V_0 - V_1).56,1}{m}$$

V_0 : volume de HCl en ml dans le test à blanc en ml ; V : volume de HCl en ml nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse ; m : masse d'huile prise en gramme ; N : la normalité de la solution potassique ; 56,1 : masse molaire de KOH.

I.2.3.2. Analyse des acides gras

Les caractérisations physico-chimiques ne fournissent pas les renseignements nécessaires pour connaître la composition des huiles, et pour cela on doit analyser la composition en acides gras qui donne des résultats clairs sur cette composition.

Toutes les méthodes chromatographiques sont utilisées pour l'analyse des acides gras, mais la plus pratique est la chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui permet d'analyser les corps gras quantitativement et qualitativement. Les acides gras doivent être analysés par CPG à l'état libre, donc ils sont préalablement transformés en dérivés, et sont généralement des esters méthyliques (EMAGs) correspondant grâce à leurs polarités moyennes et à leurs volatilités.

Cette technique permet de séparer les EMAGs en fonction de leur nombre d'atomes de carbone mais aussi en fonction du nombre et de la position des doubles liaisons, ainsi que d'éventuels groupes fonctionnels (Guignard et al., 1985).

Les EMAGs sont préparés par plusieurs méthodes décrites dans la littérature, on peut citer deux méthodes :

- Esterification des acides gras par le méthanol en présence d'un catalyseur acide, le trifluorure de bore (BF₃) selon la méthode recommandée par « International Union of Pure and Applied Chemistry » (IUPAC) (Cocallemen et al., 1988). Cette estérification a lieu sur les acides gras libres, par conséquent, il est nécessaire d'effectuer une saponification préalable par un hydroxyde alcalin (hydroxyde de potassium en milieu hydroalcoolique). Cette méthode est valable uniquement si l'huile ne comporte pas d'acides gras particuliers, tels que des acides gras polyéthyléniques ou époxydiques (Guignard et al., 1985).
- Transestérification par action du méthylate de sodium en solution méthanolique (kuksis., 1978). Cette technique n'est valable que si l'indice d'acide n'est pas trop élevé (teneur en acides gras libres ≤ à 3%).

Les identifications se font par comparaisons des temps de rétention (T_R) de produits étalons ou par calcul des longueurs de chaînes équivalentes (LCE). Cette méthode permet de caractériser les AG_s par une valeur numérique que l'on peut rechercher dans les tables de données citées dans la littérature (Paqout et Hautfenne., 1987). Mathématiquement, la LCE est définie par la formule suivante :

$$LCE(X) = m + (n - m) \frac{\text{LogTR}(X) - \text{LogTR}(M)}{\text{LogTR}(N) - \text{LogTR}(M)}$$

où M est l'acide gras saturé à m atomes de carbone ; N est l'acide gras saturé à n atomes de carbone ; n > m ; X est l'acide gras recherché.

I.2.3.3. Analyse des triglycérides

a. Introduction

Les multiples combinaisons avec les molécules de glycérol font que les corps gras sont des mélanges très complexes. La manière dont les acides gras sont associés pour former les diverses molécules de triglycérides joue un grand rôle quand aux propriétés physiques, à la réactivité chimique et aux comportements physiologiques des corps gras. La détermination de la structure glycéridique d'un corps gras, en prenant en compte la nature et les proportions de chacun des isomères, nécessite l'identification et la qualification des différents types de glycérides présents. L'isolement de ces derniers les uns des autres permet de préciser la nature et la proportion de chacun des acides gras occupant chacune des trois positions du glycérol et d'en déduire quels isomères sont présents et quelle est la proportion de chacun d'entre eux.

Afin d'obtenir le maximum de renseignements sur la nature des TAG dans les huiles, des études se font successivement :

- La nature et les proportions des acides gras pris en compte pour l'identification des TAG ;
- La nature et les proportions des acides gras en position Sn-2 du glycérol ;
- La nature et les proportions des TAG différents entre eux par la nature des trois acides gras présents.

La combinaison de ces trois types des résultats expérimentaux nous conduira à une composition en TAG, où ne seront pas distinguées les positions Sn-1 et Sn-3.

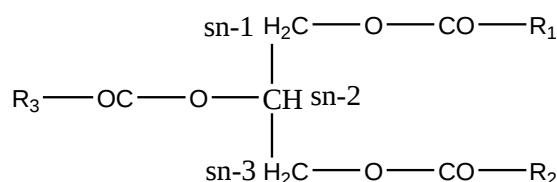
La non équivalence des trois positions du glycérol entraîne l'existence des isomères de position (lorsque les trois fonctions alcools ne sont pas acylées de la même façon) et d'isomères optiques (lorsque les deux fonctions alcools primaires sont acylées de façon différentes, le carbone médian du glycérol devenant asymétrique).

Une numérotation unifiée des trois positions du glycérol est nécessaire afin de distinguer sans ambiguïté les isomères de position des isomères optiques. Cette numérotation stéréospécifique (Sn) indique que dans la représentation de Fischer de la molécule de glycérol, dans laquelle la fonction alcool secondaire est placée à gauche de la chaîne carbonée, le carbone supérieur est le numéro 1, le carbone médian le numéro 2 et le carbone inférieur le numéro 3.

Le nombre de combinaisons ternaires des divers acides gras ainsi identifié est assez important. Si on désigne par n le nombre total d'acides gras, on peut avoir au maximum :

- N_1 TAG, si on considère l'ensemble des TAG et de leurs isomères de positions et optiques (distinction des positions 1 et 3 du glycérol), avec $N_1 = n^3$
- N_2 TAG, si l'on inclut les isomères de position, mais sans tenir compte des énantiomères (pas de différenciation des positions 1 et 3), avec $N_2 = \frac{n^3 + n^2}{2}$
- N_3 TAG, différents entre eux uniquement par la nature des AG, avec

$$N_3 = \frac{n^3 + 3n^2 + 2n}{6}$$



où R_1 , R_2 et R_3 représentent les radicaux des chaînes d'acides gras.

b. Méthodes d'analyse des triglycérides

En pratique, il n'existe pas une méthode parfaite pour déterminer la composition glycéridique exacte d'une matière grasse, mais on peut la faire en combinant plusieurs méthodes d'analyse.

La majorité des méthodes utilisées pour identifier les TAG sont des techniques chromatographiques (la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire OV₁, la chromatographie sur couche mince (CCM) de silice imprégnée d'une solution de nitrate d'argent, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) utilisant une colonne en phase inverse de type RP18).

La détermination des AG estérifiant la position 2 du glycérol a été réalisée pour la première fois en 1965 par Brockerhoff (**Monseigny et al., 1979**), en effectuant une digestion enzymatique de TAG par la lipase pancréatique de porc qui est une enzyme esterhydrolase spécifique de la position 2. Il existe une autre méthode déterminant les acides gras estérifiant les fonctions alcools primaires du glycérol. Il s'agit de la réaction de Grignard qui utilise le bromure d'éthylmagnésium, réactif sans spécificité de chaîne, ni régiosélectivité (**Goiffon et al., 1981**). Ces deux méthodes ne donnent que la répartition des AG sur les positions Sn-2 et Sn-1,3 du glycérol.

La méthode de Brockerhoff est aussi adoptée pour déterminer les AG en positions Sn-1, Sn-2 et Sn-3 (Figure I.9). Les 1,2- et 2,3-diacylglycérols (DAG) obtenus après action du bromure d'éthylmagnésium sur les TAG et séparation par CCM, sont transformés en 1- et 3-phosphatidylphénols. Ceux-ci subissent alors une digestion enzymatique par la phospholipase A₂ du venin de serpent qui n'hydrolyse que les 3-phosphatidylphénols.

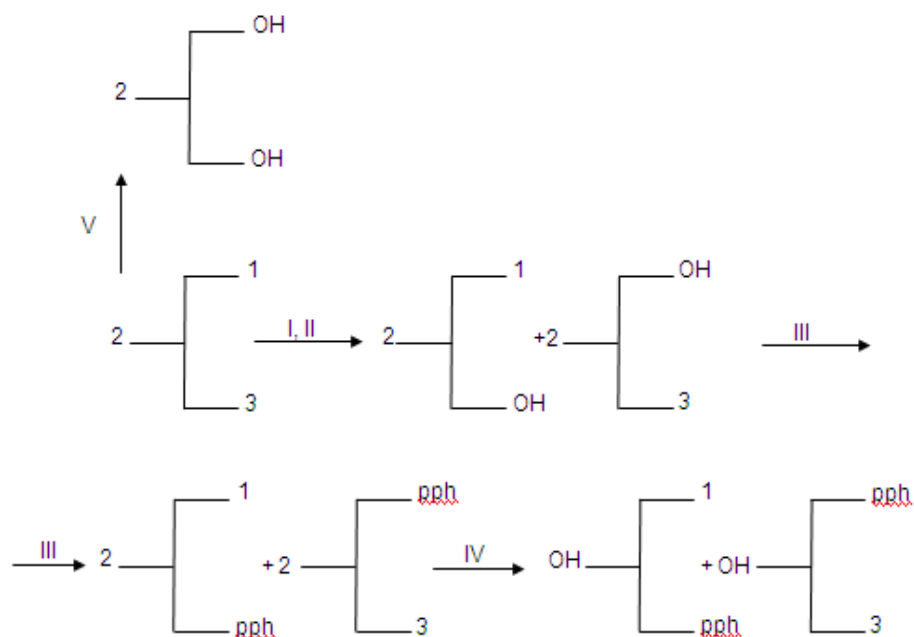


Figure I.9. Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff. I : EtMgBr ; II : C.C.M; III : dichlorophosphate de phényle, pyridine ; IV: phospholipase A₂ ; V : lipase pancréatique du porc

La figure I.10, regroupe les différentes méthodes d'analyses stéréospécifiques des TAG.

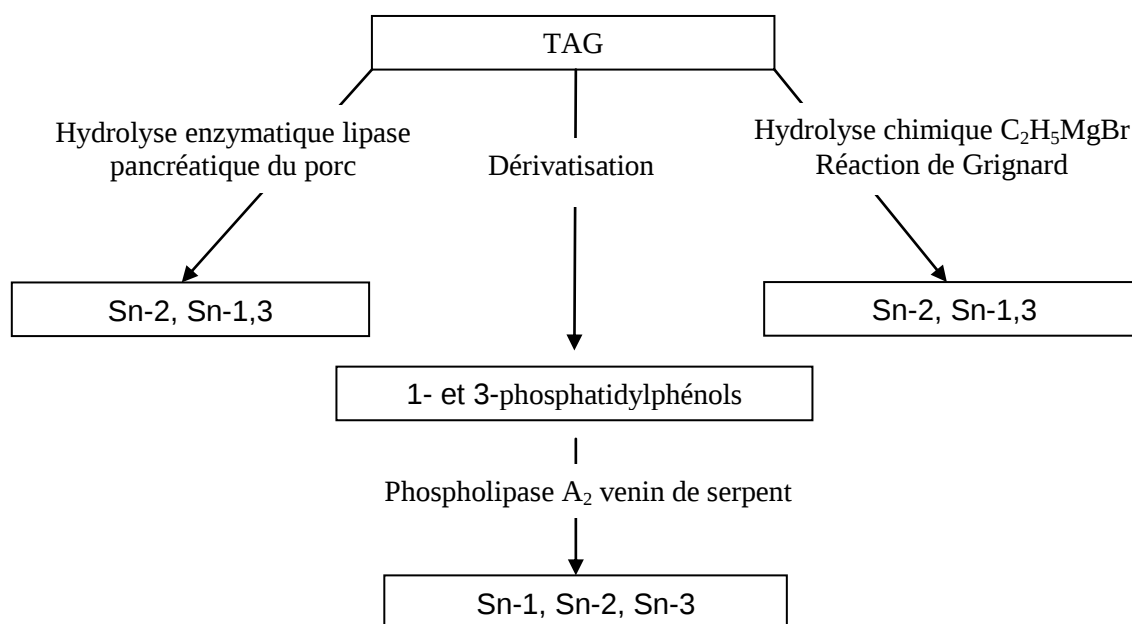


Figure I.10. Différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG

L'ensemble de ces méthodes appliquées à un grand nombre de corps gras d'origines diverses (graisses animales, huiles végétales, laits) ont permis d'énoncer des règles générales de distribution des AG au sein de TAG naturels (**Paquot et hautfenne., 1987**).

Ainsi, dans les TAG végétaux, les AG saturés estérifient préférentiellement les positions Sn-1 et Sn-3 du glycérol. La position Sn-2 est occupée principalement par les acides gras mono- ou poly-insaturés. Les acides gras particuliers se retrouvent majoritairement en position Sn-3 (Figure I.11).

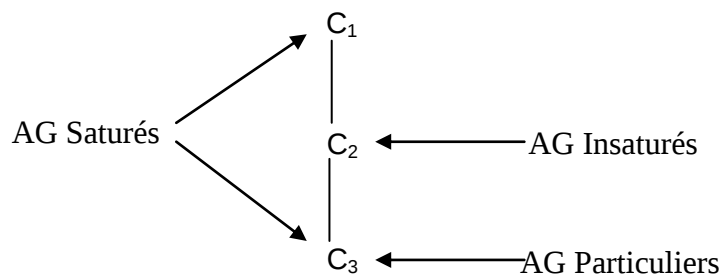


Figure I.11. Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les huiles végétales

La distribution des AG des TAG des graisses animales diffère des graisses végétales. La position Sn-1 est ainsi occupée par des AG saturés. Les AG courts et insaturés estérifient la position Sn-2. Enfin la position Sn-3 est occupée par les AG longs (Figure I.12).

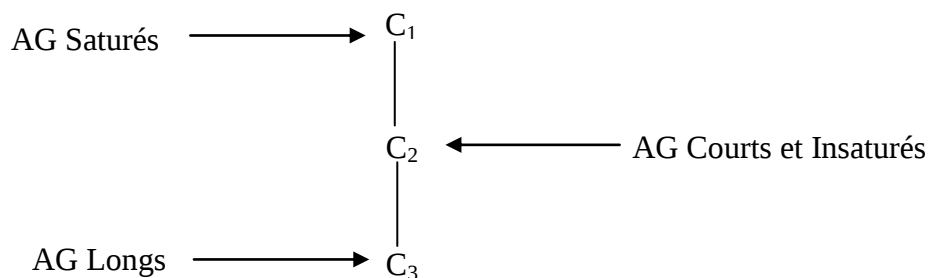


Figure I.12. Distribution des AG sur les trois positions du glycérol pour les graisses animales

L'étude de la distribution stéréospécifique des AG dans les TAG est intéressante sur plusieurs points de vue. La plus grande importance accordée à la détermination des AG en position Sn-2 est due à l'intérêt historique. Son analyse a été la première à être développée. Cette analyse est très importante puisque, lors de la digestion chez les mammifères, les 2-monoacylglycérols, ainsi que les AGL correspondants, sont absorbés par les muqueuses intestinales après hydrolyse préférentielle des TAG sur les positions Sn-1 et Sn-3 par la lipase pancréatique du porc (**Goiffon et al., 1981 ; Brockerhoff., 1971**).

Les TAG sont isolés de l'huile brute par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice par élution du l'hexane selon la norme IUPAC 2.231 (Helme et Chirouze., 1984).

Après une estérification en milieu basique, les EMAG correspondants ont été analysés par CPG.

c. Détermination des TAG à partir des acides gras en position Sn-2

Une telle détermination nécessite l'identification et la quantification des différents types de triglycérides présents, l'isolement de chacun d'entre eux afin de préciser la nature et la quantité de chacun des acides gras occupant à chacune des trois positions du glycérol afin d'en déduire quels isomères présents et quelle est la proportion de chacun d'entre eux.

Les méthodes analytiques disponibles, en particulier pour le fractionnement des triglycérides, ne sont pas encore suffisantes pour que le problème puisse être résolu dans tous les cas sans exception.

Si l'on considère que les acides gras estérifiant la molécule de glycérol en suivant une loi de distribution de position des acides gras dans les triglycérides établie par plusieurs auteurs (VanDerWal., 1960 ; Youngs., 1959 ; Coleman., 1963), il nous est alors possible, en utilisant les résultats de la digestion de la lipase pancréatique des triglycérides, de quantifier les isomères de position des différents TAG.

Soit ABC, un TAG, mixte. Six isomères différents de positions existent :

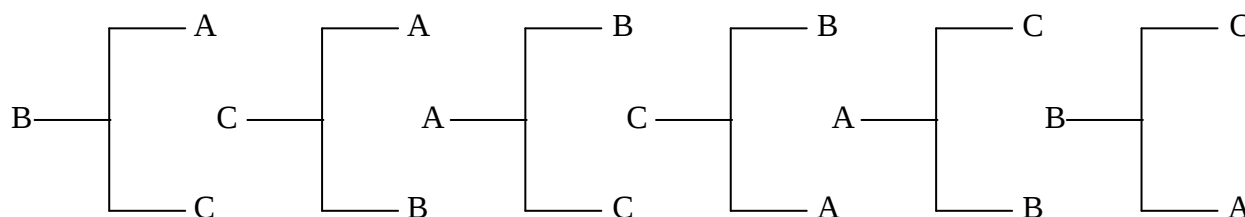


Figure I.13. Différents isomères de position d'un TAG ABC

La digestion des TAG par la lipase pancréatique donne uniquement les pourcentages des acides gras en Sn-2 et en Sn-1,3. Les positions Sn-1 et Sn-3 ne sont pas différenciées. Donc, seuls trois types de TAG peuvent être quantifiés. Ils seront notés A(BC), B(AC), C(AB). Les AG entre parenthèses estérifient les positions Sn-1 et Sn-3 (Figure I.13).

Les méthodes les plus adoptées pour la détermination de la composition des TAG sont la méthode de Coleman et la méthode de Gunstone (Théorie 1) basées sur la composition des huiles en acides gras en position-2 après hydrolyse des huiles par la lipase pancréatique, (Coleman, 1961 et 1963 ;

Gunstone., 1962). Si x est le pourcentage d'un acide gras dans le triglycéride et y le pourcentage de cet acide gras en position Sn-2 dans le triglycéride, alors que le quotient $\frac{3x-y}{2}$ représente le pourcentage de l'acide en position Sn-(1+3). (Le détail de calcul est donné dans l'annexe)

La proportion des acides gras des positions Sn-1 et Sn-3 du glycérol est calculée par la relation suivante (**Hamilton et al., 1986**) :

$$[Sn-1,3] \% = \frac{3 [T.AG]\% - [Sn-2]\%}{2}$$

I.2.3.4. Détermination de la teneur de la fraction insaponifiable

On entend par matières insaponifiables d'un corps gras, l'ensemble des produits présents dans ce corps gras qui, après saponification par traitement à l'ébullition à reflux de celui-ci par hydroxyde alcalin éthanolique, extraction par un solvant spécifié et élimination de ce dernier, restent non volatils dans les conditions opératoires décrites dans la norme NF T60-205 Nou : 1975.

I.2.3.5. Analyse des tocophérols

➤ Dosage des tocophérols totaux

La méthode adoptée pour ce dosage est celle d'Emmerie-Engel (**Emmerie et Engel., 1939**). Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier, en présence de réactifs spécifiques comme l'orthophénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm est très élevé.

Ce dosage peut être réalisé soit à partir de l'insaponifiable (**Paquot et al., 1962**), soit à partir de l'huile (**Flanzy et Dubois., 1964**). Chacun de ces dosages a ses avantages et inconvénients. Lorsque l'on effectue l'analyse à partir de l'huile brute, on ne tient pas compte des composés tocophéroliques engagés dans des combinaisons de type esters. En effet, la réaction d'oxydo-réduction, conduisant à des composés de type quinonique, ne peut avoir lieu. L'analyse effectuée ne tient compte que des tocophérols libres. Dans le cas du dosage à partir de l'insaponifiable, on dose les tocophérols totaux, initialement libres et estérifiés. Lors des différentes manipulations nécessaires, une dégradation partielle de ces composés peut avoir lieu, sauf cas particulier des huiles végétales

pauvres en esters tocophéroliques. En fin de compte, les deux méthodes de dosage donnent des résultats assez proches.

➤ Dosage quantitatif des tocophérols individuels

La méthode d'analyse préférée est par conséquent celle qui sépare et mesure les différents vitamères. Les méthodes colorimétriques s'appuyant sur la réaction d'Emmerie Engel et la réduction du chlorure ferrique mais aussi sur la réaction avec 4,7-dipyridine ou 4,7-diphennanthroline. Les complexes formés sont plutôt instables et donnent une valeur des tocophérols totaux. La méthode colorimétrique a été remplacée d'abord par la CPG, puis par la CLHP qui est maintenant la méthode préférée (Joaquín et al., 2006).

I.2.3.6. Analyse des Stérols

Il s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (Naudet et Hautfenne., 1986 ; Barreto., 2005) basée sur une réaction colorée spécifique des 3 β -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm. (Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique).

I.3. Les protéines

I.3.1. Définition

Le terme protéine qui veut dire ethymologiquement "premier" caractérisé de la matière première primitive, ce sont en effet des substances de base commune à toute forme de vie. Elles sont des principaux constituant des cellules animales et végétales (Calet et Dronne., 1996).

Les protéines sont des polymères linéaires synthétisées à partir des 20 α -aminoacides protéiques qui, après condensation, forment des liaisons peptidiques, elles sont des principaux constituants des cellules animales et végétales (Calet et Dronne., 1996 ; Jacques et al., 2001). Elles ont un rôle biologique capital, en particulier les enzymes, indispensable au déroulement des réactions dans les cellules des organismes vivants (Calet et Dronne., 1996).

Les protéines contiennent les quatre éléments C, H, O, N et parfois S, P, Zn, Cu et les α -aminoacides.

Les protéines sont divisées en deux grandes classes selon leur composition :

- ❖ **Holoprotéines** : qui libèrent par hydrolyse que les acides aminés.
- ❖ **Hétéroprotéines** : qui libèrent par hydrolyse les acides aminés et autres composées appelés : groupements prosthétiques.

Selon la nature chimique des groupements prosthétiques on distingue :

- Les nucléoprotéines
- Glycoprotéines
- Phosphoprotéines
- Métalloprotéines
- Lipoprotéines

I.3.2. Structure chimique des protéines

Le terme protéine vient d'un mot grec signifiant " de première place" d'un point de vue chimique, une protéine est un hétéro-polymère linéaire, c'est-à-dire qu'elle est le résultat de l'enchaînement linéaire de monomères : les acides aminés ou résidus (Jacques-Henry Weil., 2001).

Tous les travaux récents sur la structure des protéines se considèrent qu'une molécule est formée d'une ou plusieurs chaîne polypeptidiques dont la quelles les acides aminés sont unis les uns aux autres par des liaisons peptidiques impliquent des α -aminoacides de la série L dans les règnes végétales et animales (Figure I.14).

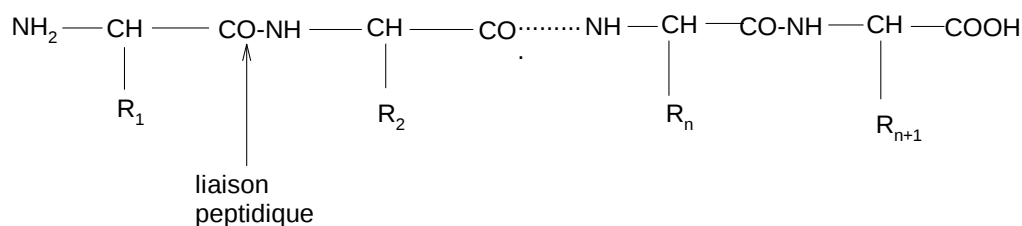


Figure I.14. Structure générale des protéines

I.3.2.1. Structure primaire

La structure primaire d'écrit la séquence des acides aminés à l'intérieur de la chaîne peptidique Cette séquence est fixée et traduit l'information contenue dans le gène qui code cette protéine spécifique (Frenot et Vierhing., 1997 ; Mokrane., 2010).

I.3.2.2. Structure secondaire

Une chaîne d'acides aminés possède au niveau des liaisons peptidiques de nombreux groupements - CO et -NH ceux-ci peuvent établir entre eux dans l'espace des liaisons hydrogènes et forment une structure secondaire (Frenot et Vierhing., 2001 ; Mokrane., 2010 ; Srinivasan et Rose., 1999).

I.3.2.3. Structure tertiaire

La structure tertiaire décrit la structure tridimensionnelle d'une protéine et se forme à la suite de distorsions de structures secondaires (Frenot et Vierhing., 2001). Elle désigne la façon dont les chaînes polypeptidiques sont courbées dans les trois dimensions pour former les structures compactes et extrémités enroulées des protéines globulaires. Cette structure permet à la protéine d'assurer de façon efficace son rôle biologique (effet catalytique des enzymes) (Mokrane., 2010 ; Turner et al., 1985).

I.3.2.4. Structure quaternaire

De nombreuses protéines sont constituées, de plusieurs sous unités ou chaînes polypeptidiques associées par des liaisons non covalentes et dans certains cas, par des ponts disulfure la structure quaternaire se réfère à la structure tridimensionnelle réalisée par l'association des sous unités (Frenot et Vierhing., 2001 ; Mokrane., 2010 ; Bratti., 1972).

I.3.3. Propriétés chimiques des protéines

- L'une des propriétés les plus intéressantes des composés protéiques apparaît dans la réaction colorée de biuret, dans un mélange protéines plus le réactif de Gornall, les ions Cu^{+2} forment avec les liaisons peptidiques un complexe coloré en violet qui absorbe dans le visible (Polnoveski et al., 1977).
- L'hydrolyse des protéines : l'hydrolyse acide dans un acide minéral comme l'acide chlorhydrique (HCl) de normalité 6N à la température de 105-110°C pendant 24 heures. Cette hydrolyse libère la totalité des acides aminés.
- Solubilité : La solubilité des protéines dans une solution aqueuse contenant des sels dépend de deux effets antagonistes liés d'une part aux interactions électrostatiques et d'autre part aux interactions hydrophobes (Jacques-Henry Weil., 2001).
- L'analyse élémentaire d'une protéine quelconque relève la présence de carbone, oxygène, hydrogène, d'azote, de soufre et parfois phosphore (Tableau I.3).

Tableau I.3 : Analyses élémentaire des protéines (Polnoveski et al., 1977).

Elément	Minimum (%)	Maximum (%)	Moyenne (%)
Carbone	50	55	52.5
Oxygène	19	24	21.5
Hydrogène	6.6	7.3	6.9
Azote	15	19	16
Soufre	0.3	2.4	1.35

I.3.4. Rôle des protéines

Le rôle des protéines se classe en quatre catégories :

- Rôle chimique : Les protéines sont des molécules indispensables au bon fonctionnement du corps humain. Leurs rôles sont multiples et dépassent la seule construction musculaire (Godon., 1996).
- Rôle biologique : Les protéines possèdent un rôle structural, fonctionnel et de réserve il ya pas de vie sans eau mais non plus sans protéine. Elles jouent un rôle essentiel dans les fonctionnements des cellules vivantes (Alais et al., 2008).
- Rôle structural : Les protéines sont les molécules de construction et de réparation des tissus du corps humain. Ce rôle de construction est indispensable pour les muscles, mais aussi pour tous les organes du corps (Alais et al., 2008). Elles participent à l'immunité, la digestion, le transport de l'oxygène, la transmission de l'influx nerveux (Godon., 1996).
- Rôle énergétique : En cas d'épuisement des glucides et des lipides, les protéines servent de source d'énergie. Elles permettent de récupérer 4 kcal par gramme de protéines (Alais et al., 2008).

I.3.5. Dosage des protéines

Un grand nombre de méthodes a été utilisé pour le dosage quantitatif des protéines : méthodes de dosage nécessitant la dégradation par voie chimique des protéines (méthode de Kjeldahl, Dumas, Kofranyi, dosage des acides sialiques), méthodes par titrage à la formaldéhyde, par fixation de colorant, par colorimétrie, par spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge et l'ultraviolet ou par fluorescence dans l'ultraviolet, méthodes turbidimétriques, méthodes électrophorétiques, méthodes chromatographiques, méthode immunologiques et par action d'exopeptidases (carboxypeptidase A). Les avantages et les inconvénients de chacune d'elles sont discutés (Sari Pihlasalo., 2011).

I.4. Composés Phénoliques

I.4.1. Présentation générale des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits et de ce fait ils sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, 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 production.

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, d'un tissu particulière.

I.4.2. Classification des polyphénols

Une classification de ces substances a été proposée par Harborne en 1980 (Tableau 1.4). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Trois principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques) ;
- Les flavonoïdes ;
- Les tanins et lignines.

Les flavonoïdes représentent la famille la plus importante des composés phénoliques. Ils désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aures et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils ont une origine biosynthétique commune et par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane ($C_6-C_3-C_6$); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Figure I.15).

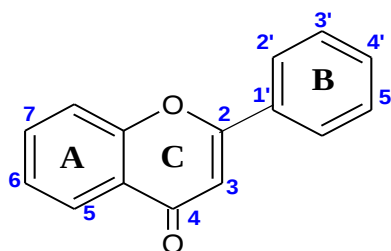


Figure I.15. Squelette de base des flavonoïdes (Ghedira., 2005).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

Tableau I.4 : Principales classes de composés phénoliques (Collin et Crouzet., 2011).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicin, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
		Eugenine	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones		
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Anthraquinones	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Quercétine, cyanidine,	Pin
	Neolignanes	daidzéine	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Pinorésinol	
		Eusiderine	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	Amentoflavone	Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

I.4.3. Propriétés biologiques des composés phénoliques

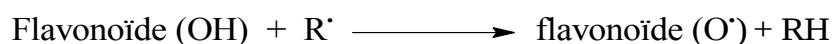
Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leurs structures chimiques. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules.

Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (Lhuillier, 2007).

Le rôle des composés phénoliques Chez les humains est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Smyth *et al.*, 2009 ; Vafeiadou *et al.*, 2009 ; Rao *et al.*, 2009 ; Macheix., 2005).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation ((Bahorun, 1997 ; Guignard, 1996 ; Di Domenico, 2012 ; Hae-Suk Kim *et al.*, 2014).

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres qui apparaissent dans plusieurs situations, telles que : l'anoxie, l'inflammation et l'auto-oxydation des lipides (Küpelı and Erdem., 2007 ; Dufour *et al.*, 2007 ; Küpelı and Erdem., 2007 ; Dufour *et al.*, 2007).



De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Calgarotto *et al.*, 2007 ; Rangkadilok *et al.*, 2007 ; Maisuthisakul *et al.*, 2007). Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (Palinski *et al.*, 1989).

Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau I.5 :

Tableau I.5 : Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme

Polyphénols	Activités biologiques	Références
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, anti-ulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydantes	(Sannomiya et al., 2005 ; Barros et al., 2008 ; Gurbuz., et al., 2009 ; Collin et Crouzet., 2011).
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, anti parasites analgésiques et anti oedémateuses	(Ito et al., 2005; Win et al., 2008 ; Hitara et al., 2009 ; Melagraki et al., 2009 ; Kalkhambar et al., 2007 ; Smyth et al., 2009 ; Collin et Crouzet, 2011).
Flavonoïdes	Antitumorales, antiparasitaires, vaso, dilatoires, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti-atherogéniques, antithrombotique, anti-allergique	(Wollgast et Anklam., 2000 ; Hitara et al., 2009 ; Tripoli et al., 2007 ; Li et al., 2008 ; Rao et al., 2009 ; Vafeiadou et al., 2009 ; Ranajit et al., 2008 ; Choi et al., 2009 ; Maurya et al., 2009 ; Raimundo et Shadel., 2009 ; Shon et al., 2004 ; Collin et Crouzet, 2011).
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant	(Bruneton., 1993).
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydant, antitumoral, antifongique et anti-inflammatoire	(Masquelier et al., 1979).
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes	(Okamura et al., 1993 ; Kubata et al., 2005).
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim et al., 2009).

I.4.4. Analyse des polyphénols

Les dosages les plus adoptés aux polyphénols sont :

- Dosage des polyphénols totaux par spectrophotométrie méthode de Folin-Ciocalteu (méthode non spécifique). Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux. Ce dosage non spécifique s'effectue à partir des extraits aqueux. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphorique et phosphomolybdique (état de valence +VI du métal) qui peut être réduit par des phénols (Il réagit avec la fonction –OH) en oxyde de tungstène et de molybdène, différents états de valence des métaux. Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée, qui passe une absorption maximale aux environs des 760 nm permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues (Catalano et al., 1999; Collin et Crouzet., 2011). Les structures électroniques des produits de réduction ne sont pas bien connues. La réaction d'oxydation est accélérée en milieu alcalin (carbonate de sodium Na_2CO_3). (Singleton et Rossi., 1965 ; Bonoli et al., 2004; Georgé et al., 2005). Pour réaliser les courbes de calibration, l'acide gallique et la (+) catéchine sont souvent pris comme référence.
- Dosage des polyphénols par méthode CLHP : Cette analyse habituellement utilisée, nous permet d'identifier les composés phénoliques individuels. Le dosage des polyphénols sur HPLC, constitue une technique séparative qualitative et quantitative, sur colonne phase inverse. Des systèmes binaires d'élution sont préconisés : le solvant A est un milieu aqueux acidifiés (acide acétique, acide phosphorique ou acide formique) et l'éluent B est un milieu organique moins polaire (méthanol, acétonitrile), éventuellement acidifié. En sortie d'HPLC, les phénols peuvent être détectés par absorption UV (préférentiellement une barrette de diode) ou par fluorimétrie.

I.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante (AAO) a été étudiée par de nombreux auteurs, au travers d'une grande diversité de principes actifs, de drogues, de molécules, de modes d'action et de grande variété de tests susceptibles de mettre en évidence cette activité. Les phénomènes caractérisant l'AAO ont été surtout abordés vis-à-vis des corps gras qui sont un des principaux champs d'application des produits à effet antioxydant. Il ya donc une multitude de résultats concernant ce type d'étude. Ces derniers ne sont malheureusement pas toujours corrélés entre eux. (Yousfi., 2005).

I.5.1. Espèces oxygénées réactives-stress oxydant

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (Tableau I.6). Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...) (Dhalla *et al.*, 2000). .

Tableau I.6 : Les principales espèces oxygénées réactives (Bartosz., 2003).

Espèces oxygénées réactives	Formule
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Anion superoxydes	$O_2^{\bullet -}$
Hydroxyle	$OH^{\bullet}$
Peroxyle	$ROO^{\bullet}$
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxydes	$RO^{\bullet}$
Oxygène singulet	1O_2
Oxyde nitrique	$NO^{\bullet}$

En effet, la pollution (oxydes d'azote...), l'absorption d'alcool ou de certains médicaments, l'exposition prolongée au soleil et le tabagisme, sont également des facteurs qui génèrent l'apparition des EOR (Patel. *et al.*, 2000 ; Griending *et al.*, 2000 ; Kohen *et Nyska.*, 2002).

Ainsi, certaines réactions enzymatiques telles que la NADPH oxydase, la lipoxygénase et la xanthine oxydase sont susceptibles de surpasser nos défenses antioxydantes naturelles (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et autres enzymes antioxydantes), provoquant ainsi des dégâts cellulaires. Ce déséquilibre nous mènent au stress oxydatif (Fang *et al.*, 2002; Servais., 2002 ; Favier., 2003 ; Boutabet., 2007 ; Xu *et al.*, 2006).

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défenses (antioxydants) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Olivier Sorg., 2004 ; Koechlin-Ramonatxo., 2006). Avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Halliwell and Whiteman., 2004; Valko *et al.*, 2006). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Olivier Sorg., 2004 ; Valko *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2005).

I.5.2. Les antioxydants

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaires. Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (Halliwell et Gutteridge., 1990). D'après Halliwell (1994), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre

- Le piégeage direct des ERO.
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

I.5.2.1. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèses sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses ou se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases (Perrin., 1992). Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA) (E320), butylhydroxytoluène (BHT) (E321) et des esters de l'acide gallique tel que gallate propylée (PG) (E310), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (Wang et al., 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu et al., 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow., 1990). Ainsi Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (Ito et al., 1985). Par conséquent, et vue le désir des consommateurs de retourner à l'utilisation des produits naturels, la recherche des sources naturelles d'antioxydants a provoqué l'intérêt des grands laboratoires spécialisés (Frankel., 1993).

I.5.2.2. Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposé. Elles incluent le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc (Koechlin Ramonatxo., 2006). Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

Chapitre -II-

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Dans ce travail le choix a été retenu sur l'espèce de citrouille (calebasse), cultivée dans la Wilaya de Laghouat (Sebgague : environ 100 km au nord ouest de Laghouat). Les citrouilles étudiées ont été récoltées entre les mois de Juillet et Août 2008 et 2009. Le choix à été fixé sur huit échantillons de graines (4 échantillons de la récolte de l'année 2008 et 4 autres de l'année 2009). Les graines des différentes citrouilles cultivées ont été ensuite séparées de la chair et séchées à l'obscurité jusqu'à leur analyse. Dans un souci de simplicité nous donnons des codes à nos échantillons d'huiles : 81, 82, 83 et 84 pour les échantillons de la récolte de 2008 ; 91, 92, 93 et 94 pour les échantillons de la récolte de 2009(Figure II.1).



Echantillon 81



Echantillon 82



Echantillon 83



Echantillon 84



Echantillon 91



Echantillon 92



Echantillon 93



Echantillon 94

Figure II.1. Photos des graines de huit échantillons étudiées de citrouille (*Cucurbita pepo*)

II.1.2. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans ce travail, sont d'un grade analytique élevé : le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH'), l'acide ascorbique, le Trolox, vitamine E, BHT, BHA, le trifluorure de bore (10% dans du méthanol) et la lipase pancréatique ont été amenés de Sigma-Aldrich. L'hexane, l'éther de diéthyle, le méthanol, l'éthanol, butanol, l'acide formique, l'acide chlorhydrique, le chlorure de calcium, de l'acétone et tous les réactifs étaient de Fisher Scientific.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction et analyse des lipides

II.2.1.a. Extraction des lipides

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en matières grasses, nous avons adopté la méthode de l'extraction par Soxhlet en utilisant les gaines de citrouille complètement broyées comme matière végétale et l'hexane comme solvant. Les extraits sont ensuite séchés par le sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C. Les extraits obtenus représentent un aspect huileux de couleur verte olive. Chaque extrait est pesé et la teneur en huile a été calculée par la relation suivante :

$$\text{Teneur en huiles} = \frac{\text{Poids de l'huile extraite} \times 100}{\text{Poids total des graines}}$$

II.2.1.b. Détermination des indices physicochimiques

Nous avons déterminé quelques indices chimiques qui caractérisent les matières grasses en utilisant les normes AFNOR (Association Française de Normalisation) (AFNOR, 1984). Ces indices permettent de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification (I.S) et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A). Nous avons également déterminé la teneur de l'huile en matières insaponifiables et quelques caractéristiques physiques telles que l'indice de réfraction et la densité.

➤ **Indice d'acide (I.A)**

La détermination de l'indice d'acide est réalisée en utilisant la norme (*AFNOR NFT60-204*). Une quantité de masse bien précise d'huile est solubilisée dans 10 ml de chloroforme. La solution organique est ensuite dosée par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,1N jusqu'au virage de l'indicateur coloré utilisé. L'indice d'acide est calculé par la relation décrite dans le chapitre I.

➤ **Indice de saponification (I.S)**

La détermination de l'indice de saponification est réalisée par la norme (*AFNOR. NF T60-206*). Une quantité d'un gramme d'huile est saponifiée à reflux par 25 ml de KOH éthanolique (0,5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par de l'acide hydrochlorique (0,5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile. L'indice de saponification est calculé par la relation décrite dans le chapitre I.

➤ **La densité d^{27}**

A une température ambiante, un volume précis de corps gras a été pesé. La masse de ce dernier est divisée par la masse du même volume d'eau à la même température (27 °C).

➤ **Indice de réfraction η^{27}**

L'indice de réfraction est déterminé dans un réfractomètre en utilisant la raie «D» du sodium à une température aussi proche que possible de la température de référence. La température est choisie de façon que le corps gras soit entièrement liquéfié. La détermination de cet indice est donnée par lecture directe sur le réfractomètre à température ambiante (27°C).

II.2.1.c. Préparation et analyse des EMAGs dans l'huile

Dans un ballon de 250 ml, on introduit 5 g d'huile et 100 ml d'une solution alcoolique de potasse (1N). On chauffe à reflux pendant 1h30 mn puis on ajoute 200 ml d'eau distillée. La phase aqueuse basique est extraite 3 fois par 50 ml d'éther, séchée par Na₂SO₄ anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. On obtient ainsi de la fraction insaponifiable. Le rendement en composés insaponifiables est obtenu par peser du contenu du ballon après évaporation sous pression réduite.

Les acides gras, sous forme de sels de potassium dissous dans la phase aqueuse, sont régénérés par addition d'une solution d'acide chlorhydrique à 30%. Ils sont ensuite extraits par 3 fois 50 ml d'hexane. La phase hexanique est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium (Na_2SO_4) anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Ensuite, 100 mg d'acides gras sont mis en solution dans 5 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 10 %. L'ensemble est porté à reflux pendant 10 mn. Après avoir laissé reposer 5 minutes, on ajoute 20 mL d'eau distillée. Après décantation, les esters méthyliques sont extraits par 3 fois 20 mL de l'hexane. La phase hexanique est lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralisation, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Les esters méthyliques (EMAGs) ainsi obtenus sont conservés au réfrigérateur à 6°C.

L'analyse des EMAGs a été effectuée par chromatographie en phase aqueuse (CPG) en utilisant un chromatographe Delsi gaz-chromatography muni d'un détecteur à ionisation de flamme FID. La chaîne chromatographique est composée d'une colonne capillaire MEGA 10 (longueur 25 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,25 μm) avec une température de 150°C à 200°C à raison de 2°C /mn. La température de l'injecteur et de détecteur est de 250°C. L'hélium est utilisé comme un gaz vecteur avec un débit de 1 mL/min.

II.2.1.d. Analyse des EMAGs dans les Triacylglycerols (TAGs) purifiés

Les TAGs sont isolés de l'huile brute par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice avec l'hexane comme éluant selon (Paquot et Hautfenne., 1987). 5g de gel de silice sont mise en suspension dans l'hexane puis transvasés dans une colonne en verre. Environ 2g d'huile sont dissous dans un minimum de volume d'hexane et déposée en tête de la colonne. L'élution est réalisée par 80 ml d'hexane. Les triglycérides purifiés sont obtenus après avoir évaporé le solvant sous pression réduite, la pureté est contrôlée sur couche mince, l'élution est réalisée par un système de solvant constitué par hexane/diéthyl éther (7/3 : V/V).

Pour préparer les EMAGs, on pèse 0,2 g de TAG purifiés et on ajoute 5 ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (NaOH/MeOH) de concentration de 2 g/100 ml, le tout doit être sous ébullition à reflux pendant 30 minutes jusqu'à disparition des gouttelettes de matière grasse. Dans le mélange maintenu à l'ébullition on ajoute 2 ml d'une solution méthanolique de trifluorure de bore (10%) par le haut de réfrigérant, et on poursuit l'ébullition pendant 10 minutes, on arrête le chauffage et après refroidissement on ajoute 20 ml d'eau distillée. Dans une ampoule à décanter de 250 ml, les esters méthyliques sont extraits 2 fois avec 30 ml d'hexane. La phase organique est lavée 4 fois par de l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage par sulfate de

sodium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé sous pression réduite. Les EMAGs ainsi obtenus sont repris dans le diéther et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur analyse par CPG.

L'analyse des EMAGs a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en utilisant un chromatographe Chrompack CP 9002 muni d'un détecteur à ionisation de flamme FID. La chaîne chromatographique est composée d'une colonne capillaire PEG (polyéthylène glycol) (30 m de longueur et 0.32 mm de diamètre et 0.25 µm d'épaisseur) avec un injecteur SPLIT 1/100 de température de 250°C. La température du four est maintenue 150°C pendant 3 min en suite elle augmente à raison de 4°C/min jusqu'à 220°C où elle se stabilise pendant 20 min. L'azote est utilisé comme un gaz vecteur avec un débit de 1 mL/min.

II.2.1.e. Analyse des acides gras en position 2

Certains organismes vivants possèdent des enzymes lipolytiques susceptibles d'agir sur les liaisons ester de glycéride, tenant compte des positions occupant sur le glycérol. La lipase extrait du pancréas du porc intervenant spécifiquement sur la position 1,3 de triglycéride et permettant d'obtenir un monoglycéride-2 et des acides gras libres, une méthode a été développée dans le cadre des travaux du conseil oléicole international et normalisée (UIPAC et AFNOR NF ISO 6800) (Figure II.2).

Après l'hydrolyse enzymatique du corps gras dans des conditions déterminées : température de milieu et pH, les monoglycérides en position-2 sont isolés par chromatographie sur couche mince (CCM), puis ces acides constitutifs sont transformés en ester méthyliques pour déterminer leur composition par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette méthode est utile pour le contrôle de pureté des huiles.

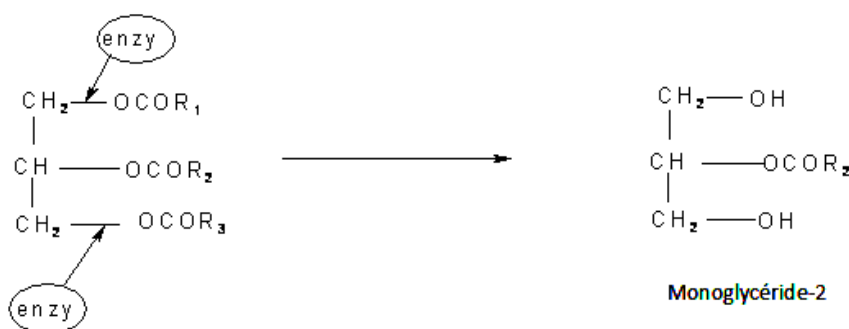


Figure II.2. Action de la lipase pancréatique sur les triglycérides

Une quantité de 1 g de TAG déjà purifiés sont hydrolysés en présence de 10 ml d'une solution tampon de 1,2M de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et 4 ml de chlorure de calcium hydraté à 22 % ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 2 ml de sel biliaire à 25%. Quand le mélange réactionnel atteint la température de 37 °C, on ajoute 100 mg de la lipase et on agite pendant 45 minutes. La réaction est stoppée en ajoutant 1ml d'une solution aqueuse d'acide hydrochlorique (4N).

Les produits de l'hydrolyse sont récupérés avec le diéthyle éther par une extraction liquide-liquide. La phase organique est lavée 3 fois avec de l'eau afin d'éliminer toutes traces d'acide, puis traitée par du sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C.

Les produits de l'hydrolyse sont solubilisés dans 1 ml de chloroforme, puis fractionnés par chromatographie préparative de couche mince de Gel de silice (Quinlin et al., 1958 ; Bilyk et al., 1991). L'élution est réalisée par un système de solvant constitué par éther de pétrole : diéthyl éther : acide formique : 6/4/0,1 (V/V/V). Après désorption des mono glycérides, ils sont récupérés par le chloroforme et sous agitation pendant deux heures. Le solvant est filtré et évaporé sous pression réduite. Les EMAGs des mono glycérides sont préparées de la même manière que celle utilisée pour les TAGs. Egalement ils sont analysés par CPG dans les mêmes conditions que celles des TAGs.

II.2.1.f. Dosage des Stérols par UV-visible

Ils s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (Naudet et Hautfenne., 1986 ; Barreto., 2005), basé sur une réaction colorée spécifique des 3 β -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6.les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm.(le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique).

A partir d'une solution chloroformique du cholestérol, de concentration 1g/l, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de concentration. On prend 1ml de chaque solution et on ajoute 2ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développe et se stabilise pendant 25 min. On mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe d'étalonnage. Les échantillons sont traités de la même manière et la teneur en stérol sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

II.2.1.g. Analyse des Tocophérols

➤ Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Nous avons adopté la méthode de dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel (Emmerie et Engel., 1939). Une droite d'étalonnage tracée à partir d' α -tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g.L^{-1} . A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution fille plus 1ml de réactif (Ortho-phenantroline) et 0.5ml FeCl_3 (solutions éthaloniques). Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm.

Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir des extraits sur l'huile extraite de la même manière et la teneur en tocophérols totaux sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

➤ Dosage des tocophérols par CLHP

Nous avons effectué l'analyse par CLHP en utilisant un appareil de type Waters muni d'une colonne apolaire à phase inverse (RP18), l'analyse se fait en mode isocratique, par l'injection directe de 20 μl d'échantillon dilué dans le pentane avec un mélange méthanol/eau (92/8 : V/V) comme éluant. La détection est faite par fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et une longueur d'onde d'émission de 330 nm. Un étalonnage externe nous a permis de quantifier chaque tocophérol dans l'huile par comparaison à des tocophérols étalons (standards) (α -, β - et δ - tocophérols).

II.2.1.h. Classification ascendante et hiérarchique (CAH)

A des fins comparatives de la composition triglycéridique et la composition tocophérolique de nos échantillons avec celle des autres huiles déjà étudiées on a utilisé une technique complémentaire de l'analyse des données, en utilisant un logiciel XLSTAT. Cette méthode est basée sur la classification ascendante hiérarchique (CAH).

II.2.2. Extraction et dosage des protéines

II.2.2.1. Extraction des protéines

Après avoir sécher, les graines des huit échantillons à l'obscurité, elles sont ensuite finement broyées et délipidées par l'hexane. Les protéines sont extraits par macération à froide de 0.5g de tourteaux délipidées avec 20 ml de chaque solvant (H_2O , NaCl et Ethanol à 70%).

Dans le but de doser les protéines individuelles (albumine, globuline, prolamine) nous avons procédé à une extraction à froid par élimination dans l'ordre « albumine, globuline, prolamine ».

L'albumine est extraite en traitant 0.5g de tourteaux avec 10 ml d'eau distillé sous agitation pendant 15mn, le mélange est centrifugé pendant 20 mn. L'opération est refaite 2 fois, à la fin on obtient les filtras qui contiennent l'albumine.

Le résidu est retraité 2 fois par une solution aqueuse de NaCl (0.5M) de la même méthode utilisée dans le cas de l'albumine. Cette extraction nous permettra d'obtenir la globuline.

En fin, la prolamine est obtenue par l'extraction du résidu par la même manière lors de l'extraction de l'albumine et la globuline mais en utilisant une solution éthanolique à 70 % comme solvant.

Chaque échantillon choisi des graines pour extraction a subi rigoureusement le même traitement d'extraction par macération.

II.2.2.2. Dosage des composés protéiques

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides amines constituant les protéines. Des comparaisons entre ces méthodes sont disponibles. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées : fiabilité, sensibilité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférents dans l'échantillon. Deux méthodes ont été choisies pour le dosage des protéines : la méthode de Biuret et la méthode de Lowry.

➤ Méthode de Biuret

Sous l'action d'une solution alcaline forte de sulfate de cuivre, les protéines donnent un complexe coloré bleu à violet pourpre (Figure II.3). Cette réaction, dite du Biuret (**Hubert, 1998**).

Cette méthode a été développée par Gornall et al 1949 qui ont appliqué la réaction du Biuret à cause la simplicité, et la rapidité, et relativement spécifique de la liaison peptidique qui forme avec le réactif de Gornall un complexe stable de coloration violette qui absorbe de la lumière visible à 540nm (**Noll et al., 1974**).

Le réactif de Gornall composé de sulfate de cuivre (coloration bleu du réactif due aux ions Cu^{2+}), hydroxyde de sodium et le tartrate double de sodium et potassium qui chélate les ions de Cu^{2+} pour

éviter leur précipitations, en milieu très alcalin d'hydroxyde de cuivre insoluble et en présence de l'iodure de potassium pour éviter la réduction du cuivre (Gravrilare et al., 1996).

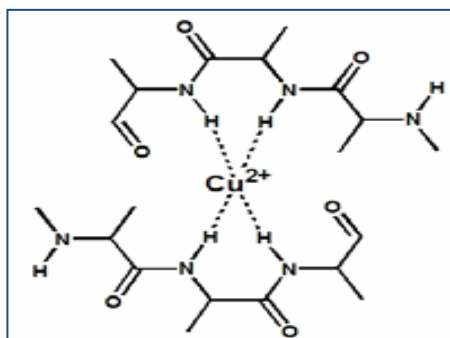


Figure II.3. Complexe de Biuret

Tout d'abord nous établis une courbe d'étalonnage de l'albumine. A partir d'une solution mère d'albumine de concentration 10 g/L préparée dans une solution de NaCl 0.5M, On a préparé des solutions fille à des concentrations bien connues, à une quantité 1ml de chaque solution et 3 ml de réactif de Gornall après incubation pendant 30 min à l'obscurité d'un spectrophotomètre à 540 nm. Une courbe d'étalonnage a été obtenue en traçant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration.

➤ Méthode de Lowry

La méthode de Lowry a été la première fois décrite en 1951 par Lowry et autre qui ont combiné une réaction au biuret, et une réaction de Folin- Ciocalteu. Dans cette méthode, le mélange d'acide phosphomolybdique et phosphotungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) réagit avec le tryptophane ou phénol de la tyrosine pour donner avec les protéines un complexe bleu de molybdène dont le maximum d'absorption se situe autour de 640 nm (Godon., 1996).

A cause des énormes risques d'interférences avec un tas de constituants présents dans les produits alimentaires (oses, osides, lipides, ions potassium, bisulfite, etc...), la méthode de Lowry ne peut s'appliquer qu'à des extraits protéiques. Elle est très sensible (Hubert., 1998).

Les réactions ont comme conséquence une couleur bleue forte, qui dépend en partie du contenu de tyrosine et de tryptophane. La méthode a réduit sensible à environ 0.01 mg de protéine/ml, et mieux est utilisée sur des solutions avec des concentrations dans l'intervalle 0.01-1.0 mg/ml de protéine (Hubert., 1998).

A partir d'une solution mère d'albumine de concentration 2 g/L préparée dans une solution de NaCl 0,5 M, On a préparé des solutions fille à des concentrations bien connues, à une quantité 0,5 ml de

chaque solution et 2,5 ml de réactif de Lowry, après incubation pendant 10 min à l'obscurité. Puis on ajoute 0,25 ml du réactif de Folin- Ciocalteu et incubation pendant 35 min à l'obscurité. Les valeurs de l'absorbance sont obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 640 nm. Une courbe d'étalonnage a été obtenue en traçant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration. Les échantillons sont traités de la même manière pour les deux méthodes choisies (Buiret et Lowry) et les teneurs en protéines individuelles seront déterminées à partir de la courbe d'étalonnage.

II.2.3. Extraction et dosage des polyphénols

II.2.3.1. Extraction des polyphénols

Pour extraire les composés phénoliques, nous avons utilisé deux systèmes de solvants : **(Méthanol/Eau)** et **(Acétone/Eau)** d'un rapport de (8/2 : v/v). Nous avons utilisé la méthodologie d'extraction et de purification des composés phénoliques décrite par M.J.Amiot (**Marie-JosBphe Amiot et al., 1986**).

Après délipidation des graines séchées, un broyage fin en a été effectué. 3g de la poudre ainsi obtenue est macérée dans 100 ml de chaque mélange : hydro-alcoolique (méthanol/eau) (8/2 : V/V) et hydro-cétonique (acétone/eau) (8/2 : V/V) pendant vingt quatre heures à température ambiante. L'extrait est filtré puis le résidu est repris pour une deuxième fois avec un volume de 50 ml du même mélange hydro-cétonique pendant vingt quatre heures à température ambiante. On obtient donc l'extrait hydro-cétonique brut. Après élimination de l'acétone de l'extrait précédant, la phase aqueuse restée est ensuite lavée plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle en présence d'un mélange de deux solutions aqueuses de 2% de sulfate d'ammonium et de 2% d'acide orthophosphorique. L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à sec après séchage par le sulfate de sodium anhydride. Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur marron jaunâtre. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol pur et conservé à 5°C donnant l'extrait phénolique purifié.

II.2.3.2. Quantification des composées phénoliques

II.2.3.2.a. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu (**Giner-Chavez., 1997**). En milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans

l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. La concentration massique des constituants utilisés dans la préparation des réactifs, a été optimisée pour obtenir la réponse analytique la plus linéaire possible en respectant le rapport réactifs/polyphénols totaux.

Pour réaliser ce test, des volumes de 100 μ l de chaque échantillon ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonate de sodium à 5% ont été ajoutés, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. Dans cette méthode on a utilisé l'acide gallique comme étalon.

II.2.3.2.b. Dosage des flavonoïdes

La méthode de (Zhishen *et al.*, 1999 ; Dewanto *et al.*, 2002) a été employé pour déterminer les teneurs en flavonoïdes des échantillons en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif. Cette méthode est basée sur la complexation entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium en présence de nitrite de sodium et la soude, ce qui entraîne une coloration rose détectable dans le visible. Les teneurs en flavonoïdes des extraits ainsi préparées ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine choisie comme étalon.

Dans une fiole jaugée de 10 ml, nous avons introduit 1ml de chaque échantillon, 5 ml d'eau distillée et 0.3 ml de 5% de NaNO_2 . Après 5 minutes, 0,6 ml de 10% d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a été ajouté. 2 mL de NaOH de concentration 1M a été ajouté 5 minutes plus tard et alors le volume était ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. La solution est bien homogénéisée et l'absorbance a été mesurée immédiatement à 510 nm contre un blanc en employant le même spectrophotomètre pour le dosage précédant.

II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Les capacités antioxydantes de nos différents échantillons sont exprimées en EC_{50} (Efficient Concentration) qui est définie comme la concentration efficace de l'antioxydant qui provoque la perte de 50% de l'activité oxydante. On peut aussi, représenter le pouvoir antioxydant de nos extraits en utilisant un autre paramètre le TAC (Total Antioxidant Capacity) qui représente l'inverse du EC_{50} ($1/\text{EC}_{50}$).

II.2.4.1. Test de DPPH

Le 1,1-diphényl1-2-picrylhydrazyle (DPPH[•]) est un radical stable et présente une absorption spécifique à 517 nm qui confère une couleur violette. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH[•] de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte (Chevalley I., 2000). La réduction du radical libre DPPH[•] par un antioxydant peut être suivi par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par la présence des extraits (Figure.II.4).

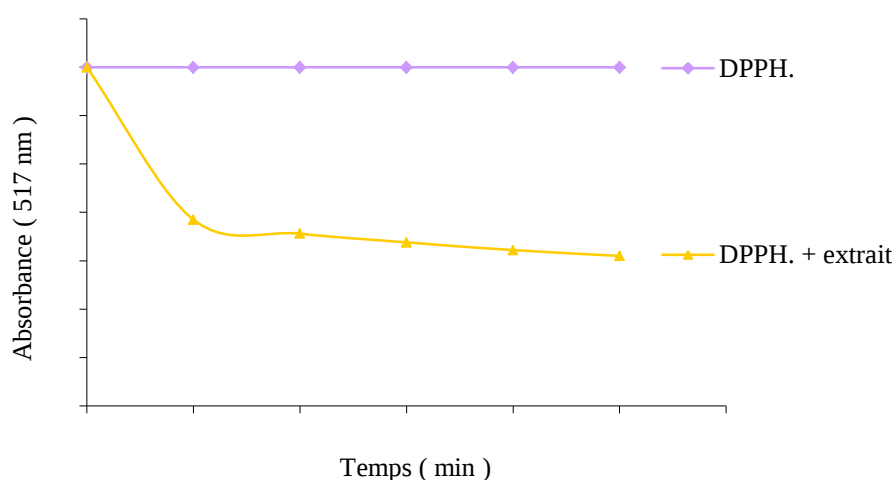


Figure II.4. Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du DPPH

Le DPPH[•] est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure.II.5). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors, d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances de nos extraits. Il est donc prévu à fournir un lien avec les réactions ayant lieu dans un système d'oxydation, tel que l'autoxydation d'un lipide ou de toute autre substance insaturée.

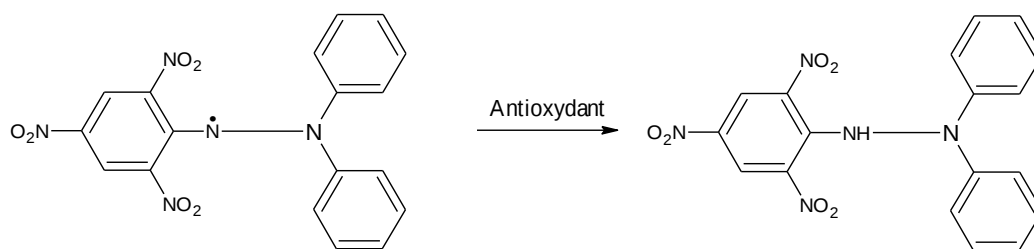


Figure II.5. Réduction du radical libre DPPH[•]

Dans le test du DPPH, le mécanisme principal d'action des composés phénoliques est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH[•] qui se transforme en une molécule stable DPPH. La capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant / DPPH[•], type de solvants, pH).

Pour réaliser ce test, 1ml de chaque extrait dilué dans le méthanol est additionné à 1ml d'une solution de DPPH[•] (250 μ M) préparé dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc. Nous avons également, testé la vitamine C, la vitamine E, le BHA, le BHT et le trolox des antioxydants commerciaux pris comme antioxydants de référence.

II.2.4.2. Test du phosphomolybdate (PPM)

Le test du PPM (Phosphomolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant. Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide, ayant un maximum d'absorption à 695 nm. On mesure l'évolution de la coloration du complexe molybdène (V) en présence d'antioxydant (Figure II.6). A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des lipides, des protéines et des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) (Pilar Prieto et al., 1999).

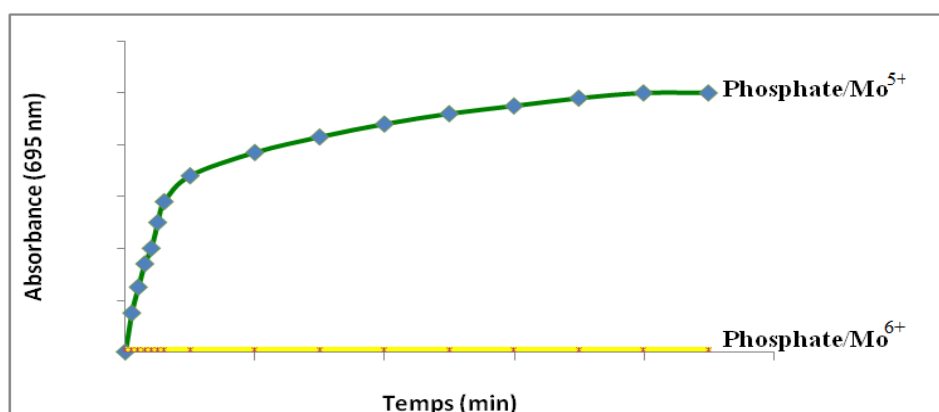


Figure II.6. Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du PPM

Ce test a pour but d'évaluer le statut antioxydant, par la mesure du pouvoir réducteur des extraits dans une réaction colorimétriques d'oxydoréduction. En effet, 1 mL de chaque extrait dilué est ajouté à 1 mL du réactif phosphomolybdique (28 mM de phosphate de sodium, 4 mM de molybdate d'ammonium et 0,6 M d'acide sulfurique), puis le mélange est placé dans un bain marie à une température de 70 °C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc. Également, nous avons comparé le pouvoir réducteur de nos extraits phénoliques à la vitamine C, la vitamine E, le BHA, le BHT et le trolox pris comme antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

Chapitre -III-

Résultats et discussion

III.1. Extraction et analyse des lipides

III.1.1. Teneur et caractéristiques physico-chimiques des lipides

Les huiles des graines de citrouille visuellement ont des couleurs vert olive, elles sont liquides à température ambiante avec une odeur agréable. La teneur en huile des graines varie de 15,8 à 33,5% (m/m) (Tableau III.1). Les quantités en huile dans les graines de citrouille collectées en 2009 sont plus supérieures à celles récoltées en 2008. De même, on remarque dans cette étude que la teneur en huile dans nos graines est comparable ou par fois dépasse celle des graines comestibles connues, comme le Cotton (22-24%), tournesol (30-35%) soya (18-22%) et l'olive (15-50%) (FAO., 1993). La teneur en huile des graines étudiées est aussi semblable avec celle d'autres graines et fruits locaux étudiés dans notre laboratoire, comme le cas des fruits noirs de *Pistachier lentisque* (32,82 %) (Charef et al., 2008), et la teneur trouvée par Yousfi et al concernant l'huile d'arganier (39,5%) (yousfi et al., 2009).

Ces valeurs sont en accord avec d'autres espèces de *cucurbita* (9,8-52,1%), et différentes avec d'autres variétés de *cucurbita pepo* (31,2-51,0%) (Nyam et al., 2009). La quantité en huile de nos graines est très inférieure par rapport à des variétés européennes (60%) (Younis et al., 2000), et d'autres égyptienne (51%) (El-Adawy et Taha., 2001) et comparable à des variétés d'Érythrée (22-35%). Par contre cette quantité en huile, est supérieure à celle de Lima beans (19,8%) et chickpeas (19%) (Oshodi., 1992), et à ceux des graines du Sorgho et de Mil perlé (6,2 à 6,5%) et (4,34 à 4,68 %) respectivement (Hadbaoui et al., 2010). Cette différence en teneur en huile peut être expliquée par les différentes méthodes d'extraction et aux différents modes de traitement de la matière végétales. Cette différence en quantité d'huile peut être due à la différence en climat de cultivassions, le degré de maturité des graines, la période de la cueillette des graines et les méthodes d'extractions utilisées (solvants, température). Ces résultats en teneur en huile nous permettent de considérer ces graines comme source végétales en huile domestique et industrielle (Tableau III.1).

L'insaponifiable est une fraction minoritaire dans les huiles végétales qui est extractibles par les solvants peu polaires après une hydrolyse alcaline des huiles. Cette fraction est un mélange complexe qui contient des composés nonglycéridiques connus par leurs activités biologiques importantes comme les hydrocarbures, aldéhydes, cétones, alcool, les pigments et les vitamines solubles (vitamine A, vitamine E). Ces composés mineurs de l'insaponifiable contiennent des substances antioxydantes bénéfiques pour la santé humaine (Mellerup et al., 2007). Quantitativement,

la teneur en matière insaponifiable dans les huiles des graines de citrouille collectées en 2008 est plus supérieure à celle de 2009. Les valeurs des pourcentages en matières insaponifiables sont consignées dans le tableau III. 1. Ces valeurs sont plus importantes que les huiles de graines de Congo (Minzangi et al., 2011), palme, tournesol (Rossel., 1987) et l'huile d'arganier (Yousfi et al., 2009), mais ces valeurs appartiennent à l'intervalle 3-7% qui sont déjà reportées par Anwar et al (Anwar et al., 2005) pour les graines de Riz. Une analyse approfondie et détaillée de la composition de la fraction insaponifiable de cette huile sera intéressante.

Les valeurs des constantes physico-chimiques des huiles des graines de citrouille étudiées sont regroupées dans le tableau III.1. Les constantes physiques des huiles nous donnent des informations préliminaires sur les structures chimiques ainsi les fonctions chimiques qui peuvent être renfermées dans la structure des lipides. Il est aussi possible de nous donner des indications sur la pureté et la qualité des huiles (Gohari et al., 2011).

Tableau III.1. Constantes physico-chimiques et teneur des huiles de graines de citrouille

	Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)				Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)			
	81	82	83	84	91	92	93	94
Teneur en huile (%)	15,8	26,7	27,2	22,5	27,1	29,8	28	33,5
I.A (mg (KOH)/g)	14,9 ± 0,23	16,8 ± 0,43	15,8 ± 0,85	17,2 ± 0,67	11,2 ± 0,22	15,1 ± 0,26	28,7 ± 0,39	23,4 ± 0,65
I.S (mg (KOH)/g)	195 ± 0,5	198,8 ± 3,7	198,6 ± 5	197,2 ± 1,4	197,5 ± 0,5	198,2 ± 1,1	197,7 ± 0,2	199,9 ± 0,1
η^{27}_D	1,468 ± 0,1	1,467 ± 0,2	1,468 ± 0,1	1,469 ± 0,2	1,469 ± 0,1	1,468 ± 0,5	1,468 ± 0,1	1,471 ± 0,3
d^{27}	0,846 ± 0,01	0,831 ± 0,04	0,882 ± 0,04	0,896 ± 0,06	0,875 ± 0,04	0,837 ± 0,03	0,879 ± 0,04	0,895 ± 0,08
FI % (m/m)	6,54	5,50	4,15	2,33	3,18	3,40	2,96	4,72

I.A : Indice d'acide ; I.S : indice de saponification ; η^{27}_D : indice de réfraction ; d^{27} : densité;
FI (%): fraction insaponifiable

L'indice de réfraction est utilisé pour mesurer la variation de l'insaturation dans les huiles après l'hydrogénation. L'indice de réfraction des huiles dépend de leurs masses moléculaires, la longueur de la chaîne des acides gras, le degré d'insaturation et le degré de la conjugaison (Nichols et Sanderson., 2003). Les huiles des graines de citrouille montrent des valeurs d'indice de réfraction qui s'échelonnent de 1,467 à 1,471 (Tableau III.1), ces valeurs sont similaires à celles publiées par Gohari Ardabili de *cucurbita pepo* (1,4662) et Alfawaz de *cucurbita maxima* (1,4656). Ces valeurs sont inférieures à celles des huiles d'Arganier (1,4853) (yousfi et al., 2009) et à celles des huiles de

tournesol et d'olive et supérieures à celles des huiles de palme et sont dans la même fourchette des huiles de canola et maïs (Gohari et al., 2011).

Les valeurs de la densité des huiles étudiées sont rangées de 0,831 à 0,896 (Tableau III.1). Ces valeurs sont comparables à celles trouvées par Gohari (Gohari et al., 2011) des huiles de *cucurbita pepo* d'Iran (0,9151). Toutes fois ces valeurs sont inférieures à celles reportées pour l'huile d'olive (0,910-0,920), de canola (0,914-0,920) et d'autres huiles de graines oléagineuses (Minzangi et al., 2011) et l'huile d'arganier (0,9450) (yousfi et al., 2009).

La « Codex Alimentations Commission » recommande les valeurs maximales acceptées pour les indices d'acide sont 10 et 4 mg KOH/g d'huile pour l'huile de palme et l'huile de noix de coco respectivement (Alfawaz., 2004). L'huile de faible acidité est la plus souhaitable à recommander pour la consommation. Ces huiles doivent avoir une acidité inférieure à 0,1 mg KOH/g (FAO., 1993). Toutes les huiles étudiées possèdent des valeurs fortes en acidité, les valeurs des indices d'acidité sont supérieures à 10 mg KOH/g (Tableau III.1). Les résultats de l'étude actuelle sont plus supérieurs de toutes les huiles les graines de citrouille (*cucurbita pepo*, Subsp. *Pepo*, Var. *Styriaca*) poussant en Iran (Gohari et al., 2011) et quelques huiles de graines de Congo (Minzangi et al., 2011). Nos résultats et notamment les échantillons 93 et 94, sont similaires aux valeurs trouvées par Charef et al pour les fruits (Rouges) de *Pistacia.L* (Charef et al., 2008).

Ces résultats peuvent être expliqués que les huiles étudiées ont subi une dégradation au cours de leur stockage ou les graines n'ont pas abouti à leur stage de maturation (biosynthèse incomplète), et pour cela ces huiles ne sont pas conseillées pour l'alimentation.

L'indice de saponification est un indicateur de la masse moléculaire des acides gras et des triglycérides ainsi la longueur de chaîne de carbone qui contient l'huile. Il est inversement proportionnel à la masse moléculaire de l'huile. Les valeurs obtenues de l'indice de saponification des huiles étudiées varient de 195,05 à 199,86 mg KOH/g (Tableau III.1). Ces valeurs appartiennent à la fourchette 174-197 reportée pour des huiles de graines de *cucurbita pepo* (Nichols et Sanderson., 2003). Ces valeurs indiquent que les huiles des graines de *cucurbita pepo* contiennent des acides gras avec des longues chaînes de carbone comparativement aux graines des huiles de noix de coco (248-265) et de palme (230-254) (Nichols et Sanderson., 2003). Nos résultats sont en accord avec ceux de Markovic et Bastic (185,5-195,3) (Markovic et Bastic., 1976), tandis qu'ils sont faibles que ceux reportés par Al-Khalifa, El-Adawy et Tsaknis et al (200-218) (Al-Khalifa., 1996 ; Tsaknis et al., 1997 ; El-Adawy et Taha., 2001), par contre ils sont supérieurs à la valeur 184,4 pour l'huile d'arganier trouvée par yousfi et al (yousfi et al., 2009), elles sont encore plus supérieures à la valeur 132,3 pour la

Cucurbita pepo L africaine trouvée par Younes et al (Younis et al., 2000) et aux valeurs (147,85 et 154,60) pour les huiles de *Pistacia lentiscus* L trouvées charef et al (Charef et al., 2008) . Toutefois nos valeurs sont comparables avec d'autres pour les huiles de coton, palme et beaucoup de gaines de plantes médicinales (ALfawaz., 2004). Beaucoup d'huiles végétales possèdent des valeurs d'indices de saponification rangés entre 195 et 200 (Nyam et al., 2009). Toutes les huiles des graines de la présente étude possèdent des indices de saponification appartiennent à cette fourchette. Les huiles ayant des valeurs d'indice de saponification élevées environ 300 sont utilisées pour la fabrication des savons qui n'est pas le cas de cette étude.

III.1.2. Analyse des acides gras dans l'huile

Les résultats de la composition en acides gras des huiles de graines de citrouille peuvent être utilisés pour évaluer la stabilité et la qualité nutritionnelle. Un degré d'insaturation d'huile plus élevé le rend plus sensibles à la dégradation par oxydation. D'autre part, il y a beaucoup de données pour recommander la production en acides gras saturés et une augmentation modérée de monoinsaturés et n-3 et n-6 polyinsaturés AGs en nutrition humaine afin de prévenir les maladies coronariennes et d'autres maladies (Compaoré et al., 2011). La composition d'AG varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la variété, zone de culture, le climat et la maturité des graines (Rombaut et al., 2009).

L'analyse par Chromatographie en phase gazeuse (Figures : 1, 2, 3 et 4. Annexe 1) a montré que les AGs dominants trouvées dans les huiles étudiées sont: le palmitique C16: 0 (13,9 à 20,0%), l'acide stéarique C18 :0 (9,6à 17,7%), l'acide oléique C18:1 (26,2 à 39,6%) et l'acide linoléique C18:2 (28,7 à 44,0%). La composition en acides gras des huit échantillons des graines de citrouille étudiées sont regroupés dans le tableau III.2. Ce profil d'AG est confirmé par d'autres études (Younis et al., 2000; Markovic et Bastic., 1976 ; Bagepalli et al., 2010). Les huiles de graines de citrouille étudiées contiennentt une proportion totale en acides gras saturés qui s'échelonnent entre 24,63 et 40,5% dont l'acide palmitique est le majoritaire (plus de 14%) suivi par l'acide stéarique (plus de 9,6%), par contre la somme des acides gras insaturés représente un total de 59,3 à 74,22% de la totalité des acides gras. Ce pourcentage élevé en acides gras insaturés est aussi trouvé dans d'autres études dans les espèces de Cucubitacées (Stevenson et al., 2007 ; Bagepalli et al., 2010). Ces valeurs appartiennent à la même fourchette reportée pour des huiles de graines du Sorgho et de Mil perlé (Hadbaoui et al., 2010). Les acides gras majoritaires sont l'acide linoléique suivi par l'acide oléique avec des proportions différentes.

Tableau III.2. Composition relative en acides gras de l'huile de graines de citrouille

	Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)				Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)			
	81	82	83	84	91	92	93	94
C14 : 0	0,48	0,28	0,38	0,31	0,36	0,30	-	0,26
C16 : 0	20,0	16,2	18,8	16,2	15,3	13,9	18,0	15,8
C16 : 1	0,26	0,19	-	0,17	0,16	0,19	0,23	0,18
C18 : 0	17,7	11,1	11,3	11,9	12,7	9,6	10,2	11,9
C18 : 1	29,3	32,5	35,8	38,7	33,7	39,6	32,6	26,2
C18 : 2	28,70	37,4	31,06	30,17	35,02	34,2	36,5	44,0
C18 : 3	1,0	0,42	0,35	0,40	0,36	0,23	0,24	0,32
C20 : 0	1,5	1,1	0,99	0,89	1,04	0,65	0,87	0,72
C22 : 0	0,45	0,26	0,30	0,27	0,25	0,18	0,25	0,22
C23 : 0	0,06	-	-	-	-	-	-	-
C24 : 0	0,31	-	-	0,16	0,14	-	-	-
Autres	0,20	0,55	0,84	0,83	0,97	1,15	1,11	0,4
Total AGS	40,5	28,94	31,77	29,73	29,79	24,63	29,32	28,9
Total AGI	59,3	70,51	67,39	69,44	69,24	74,22	69,57	70,7
AGI / AGS	1,46	2,44	2,12	2,33	2,32	3,01	2,37	2,44

AGI: Acides gras insaturés; **AGS:** Acides gras saturés.

Dans d'autres investigations menées pour l'étude de la composition en acides gras de *cucurbita pepo* (El-Adawy et Taha., 2001), les pourcentages de l'acide linoléique (43,1-55,6%) sont plus élevés par rapport aux résultats trouvés par la présente étude. Toute fois la composition en acide linoléique est comparable à celle trouvée dans les variétés Européennes : 36,6 à 60,8% (Murkovic et al., 1996). Comparativement à d'autres graines, les proportions en acides oléique et linoléique de nos graines de citrouille sont comparables à celles des huiles de graines de melon (65,6%), les huiles de graine de Kenaf (74,8%) et les huiles de graines de roselle (64,1%) (Nyam et al., 2009). Ces résultats montrent que les huiles des graines de *cucurbita pepo* sont une source riche en acide linoléique et en acide oléique ce qui est un indice favorable pour que ces huiles peuvent être utilisées comme des huiles alimentaires. Malgré la proportion élevée en acides gras insaturés dans les huiles de graines de citrouille, l'acide linoléique a enregistré une proportion très faible (0,23-1,00%), qui est en accord avec d'autres études similaires concernant les huiles de *Pistachier* et de *Quercus* (Charef et al., 2008), l'huile de fruit de l'arganier (yousfi et al., 2009) et les huiles de graines du Sorgho et de Mil perlé (Hadbaoui et al., 2010). De même les faibles proportions enregistrées pour les autres acides gras sont aussi en accord avec d'autres résultats reportés dans la littérature (Stevenson et al., 2007).

Les traces en d'autres acides gras comme l'acide linoléique trouvées dans les huiles de graines récoltées en 2008 sont plus supérieures à celles récoltées en 2009 (Tableau III.2). Cette conclusion est basée sur l'hypothèse que l'erreur expérimentale rencontrée dans la mesure de ces quantités de trace est négligeable. Ces observations sont également en conformité avec les résultats rapportés qu'en raison de la date de la culture. Il est à noter que des traces d'acide nervonique C22:0 (< 0,45%) ont été trouvées dans tous les échantillons d'huile de graines analysés dans cette étude.

En outre, Les valeurs des quotients AGI/AGS sont rangées entre 1,46 et 3,01 (Tableau III.2). Ces quotients dans les huiles des graines de citrouille récoltées en 2009 sont plus supérieurs à ceux récoltées en 2008. Toutefois, les quotients sont plus élevés à ceux trouvés dans les graines de l'huile de l'Arganier (2,1) (Yousfi et al., 2009) et l'huile de fruits de *Pistachier* de l'Atlas algérien (2,7) (Yousfi et al., 2005) et plus faibles que ceux des huiles des graines de Sorgho en Algérie (plus de 5,7) (Hadbaoui et al., 2010).

III.1.3. Analyse des acides gras en TAGs et en 2-MAGs

L'étude de la structure des triglycérides naturels a été étudiée par plusieurs méthodes depuis un très bon moment. La plus part de ces méthodes ont été basées sur la distribution des acides gras dans les trois positions de molécule du glycérol. Ces études ont abouti à proposé des théories à savoir : théorie de distribution aléatoire, aléatoire équivalente et aléatoire restreinte. En 1956 Mattson et Beck (Mattson et Lutton., 1958) montre, que la lipase pancréatique est une enzyme spécifique pour la rupture de liaison ester au niveau des positions 1 et 3 du triglycéride. Cette observation a donné une nouvelle information et un avantage de plus dans l'étude de la structure des triglycérides. L'absorption des acides gras ne dépend que de la longueur de chaîne des acides gras mais aussi de leur distribution dans les trois positions du triglycéride (Kubow., 1996). Dans la stéréochimie des acides gras, le carbone du milieu est numéroté sn-2. La lipase pancréatique hydrolyse les acides gras en position sn-1,3 des triglycérides pour produire les acides gras libres et les 2-MAGs (Carriere et al., 1993). Les acides gras dans la position sn-2 des triglycérides sont absorbés préférentiellement par les intestins, par contre les autres acides gras saturés estérifiés les position-1,3 et notamment qui contiennent des longues chaînes de carbone comme l'acide palmitique ne sont pas absorbés, en partie à cause des points de fusion sensiblement supérieures à la température corporelle et une forte tendance à former des savons insolubles avec des cations divalents tels que le calcium et le magnésium Innis et Dyer., 1997). Des études récentes ont démontrés que par changement de la position des distributions (augmentation de la proportion des acides gras en position-2 du triglycéride) peuvent favoriser l'absorption de l'huile. Dans la présente étude nous avons investigué la position de distribution des acides gras dans les triglycérides des huiles de graines de citrouille.

Les triglycérides neutres des huit échantillons d'huiles sont purifiés par une colonne chromatographique ouverte, ils sont contrôlés par chromatographie sur couche mince (CCM) (Figure III.1).

Les résultats de la purification des huiles de graines montrent que la majorité des espèces moléculaires lipidiques sont des TAGs (Spot important). Par comparaison, les AGs libres et les glycérols sont faibles, ce qui est en accord avec d'autres investigations (Pham *et al.*, 1998). Les TAGs ont été ensuite estérifiés et analysés par CPG (Figure 5, Annexe 1).



Figure III.1. CCM de l'huile brute (à gauche) et fraction des TAG à droite, révélée avec l'iode

Les résultats de la composition des triglycérides neutres en acides gras sont mentionnés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Composition relative des AG dans les TAG_s et en position Sn-2 (récoltes 2008 et 2009)

	TAGs %								2-MAG %							
	Graines de citrouille (Récolte 2008)				Graines de citrouille (Récolte 2009)				Graines de citrouille (Récolte 2008)				Graines de citrouille (Récolte 2009)			
	81	82	83	84	91	92	93	94	81	82	83	84	91	92	93	94
C12:0	-	-	2,7	-	0,3	-	-	6,3	0,2	0,6	0,5	-	-	-	-	1,1
C14:0	2,3	-	10,1	1,4	3,0	2,0	2,4	0,5	0,7	0,6	1,5	-	-	1,64	1,0	0,8
C16:0	12,4	14,4	15,4	10,2	10,6	13,4	13,6	12,5	6,2	3,0	2,3	2,0	4,0	4,77	1,5	13,7
C18:0	7,6	9,2	5,8	7,0	8,0	9,4	9,3	7,7	1,4	1,5	2,3	-	2,2	3,25	3,2	3,9
C18:1	27,0	38,6	16,8	25,6	29,8	32,1	19,3	17,1	38,4	39,5	29,9	28,9	37,3	29,1	17,7	20,3
C18:2	49,2	37,8	49,1	55,8	47,3	43,2	55,4	55,9	52,5	53,4	59,3	69,1	55,5	61,26	73,0	59,4
C18:3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,51	0,2	1,6	-	-	-	1,2	-
C20:0	1,4	-	-	-	1,0	-	-	-	-	0,4	0,8	-	-	-	-	-
C20:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	0,7
C20:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-
C23:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
TAGS	23,8	23,6	34,1	18,6	23,0	24,7	25,3	27,0	8,5	5,7	7,3	2,0	6,2	9,6	8,1	19,5
TAGI	76,2	76,4	65,9	81,4	77,0	75,3	74,7	73,0	91,5	94,3	92,9	98,0	93,8	90,4	91,9	80,5

TAGS: Total Acides Gras Saturés; **TAGI:** Total Acides Gras Insaturés

Les résultats révèlent que tous les triglycérides des huiles de graines de citrouille contiennent un pourcentage important d'acides gras insaturés (de 65,9 à 81,4%), avec l'acide linoléique comme composant insaturé majeur suivie par l'acide oléique avec une quantité qui variait entre 17,1 et 38,6%. Alors que dans tous triglycérides des huiles des graines de citrouille étudiées, la présence de l'acide myristique C14:0 est faible (< 3%), alors qu'il était complètement absent dans l'échantillon 82 et relativement plus élevé dans l'échantillon 83. Les contenus en acides palmitique et stéarique sont remarquables, ils varient respectivement entre 10,2 à 15,4 et de 5,8 à 9,4%, respectivement. Quelques échantillons des triglycérides des graines de citrouille ont montré des petites quantités en acide laurique. Par contre, nos résultats ne montrent pas l'existence de traces des acides C20 :0 et C22 :1 comme il est publié par Al-khalifa (Al-Khalifa., 1996). Cependant, le taux de C18: 2 et d'autres acides gras varie entre les échantillons visés. Si nous comparons nos tryglérides des huiles de graines de citrouille avec d'autres triglycérides d'huiles de graines oléagineuses comme les huiles de tournesol, de carthame, de sésame et de graines de lin (Mattson et Lutton., 1958), l'huile de graines d'arganier (yousfi et al., 2009) et l'huile de Fruits (rouge) *Pistacia lentiscus* (Charef et al., 2008), il est évident que les pourcentages en acides palmitique et stéarique sont comparables. De plus, le

contenu en acide gras essentiel comme l'acide linoléique (C18: 2) dans nos échantillons est comparable avec l'huile de tournesol et légèrement inférieur aux huiles de pépins de raisin et de graines de carthame.

Plutôt la composition des acides gras dans tous les triglycérides des graines de citrouille est en accord avec les travaux publiés sur d'autres graines de Cucurbitacées qui montrent d'une façon générale que les huiles de ces graines contiennent des faibles proportions (en acides gras saturés et des proportions élevées en acides gras polyinsaturés qui sont doués par des propriétés importantes pour la santé humaine (Chang Chew Sew et al., 2010); Les proportions élevées en acides gras polyinsaturés (AGPI) surtout C18:2 et monoinsaturés (AGMI) indiquent la possibilité de l'oxydation des huiles de graines de cucurbitacées. Aucune huile de cucurbitacées n'a présenté une utilisation industrielle, mais quelques une ont été utilisées comme huile de table dans quelques pays africains et moyen-Orient (Al-Khalifa., 1996). Selon Smit et al, les acides gras essentiels sont des composés bénéfiques pour la santé et qui ne sont pas synthétisés par le corps humain et donc il faut les consommer à travers un régime alimentaire (Smit et al., 2004).

Les triglycérides purifiés à partir des huiles sont hydrolysés par la méthode de Luddy et al (Luddy et al., 1964), procédure pour analyser la composition des 2-MAGs. Les 2-MAG ont ensuite été séparées à partir du produit lipolytique par TLC préparative silicate. Les 2-MAG pures sont immédiatement estérifiées et soumises à une analyse par CPG (Figure 6, Annexe 1). Le tableau III.3 montre les pourcentages des acides gras en position-2 du triglycéride (2-MAG). Dans tous les échantillons, on remarque que les acides gras insaturés sont les plus dominants comme l'acide linoléique dont son pourcentage varie de 52,5 à 73,0% suivi par l'acide oléique avec un pourcentage de 17,8 à 39,5%. D'autres acides gras sont aussi présents dans les monoglycérides-2 à savoir : l'acide palmitique (moins de 14%) et l'acide stéarique (moins de 4%). A l'exception de l'échantillon de 94, tous les échantillons des graines de citrouille, montrent que la somme des pourcentages des acides gras insaturés en position-2 est très élevée, elle représente 90% de la totalité des acides gras totaux. Ce résultat est en accord avec les travaux de Mattson et Volpenhein (Mattson et Volpenhein., 1961), les travaux de Yousfi et al (Yousfi et al., 2005; Yousfi et al., 2009) et les travaux de Charef et al (Charef et al., 2008), qui montrent que les acides oléique et linoléique sont préférentiellement attachés à la position 2. Ce résultat est aussi en accord avec la théorie de la distribution de position décrite par Van Derwal (VanDerWal., 1960), Coleman et Fulton (Coleman., 1961), Gunstone (Gunstone., 1962) et Youngs (Youngs., 1959), où le 2-MAG contient principalement des acides gras insaturés à 18 atomes de carbone. Le reste des acides gras est distribué aléatoirement dans les deux autres positions 1 et 3 dans la molécule du triglycéride. La teneur en TAG composants de huile de *cucurbita pepo* a été

calculée à partir des pourcentages en AGs trouvés dans les positions 1,3 et ceux qui sont déterminés dans la position 2 du triglycéride et en utilisant les deux théories de distribution de Gunstone (Gunstone., 1962) et Coleman (Coleman., 1961). Nos résultats concordent bien avec la "théorie de la position de distribution", représentée par des courbes publiées par Gunstone (Gunstone., 1962). Les résultats de la structure glycéridique sont en accord avec les corrélations des courbes de Gunstone (Figure III.2) et (Tableau 5 ; Annexe 1). Les résultats des TAGs sont donnés dans le tableau 3 (Annexe 1). Les valeurs de la composition des TAGs moins de 0,1% n'est pas mentionnés.

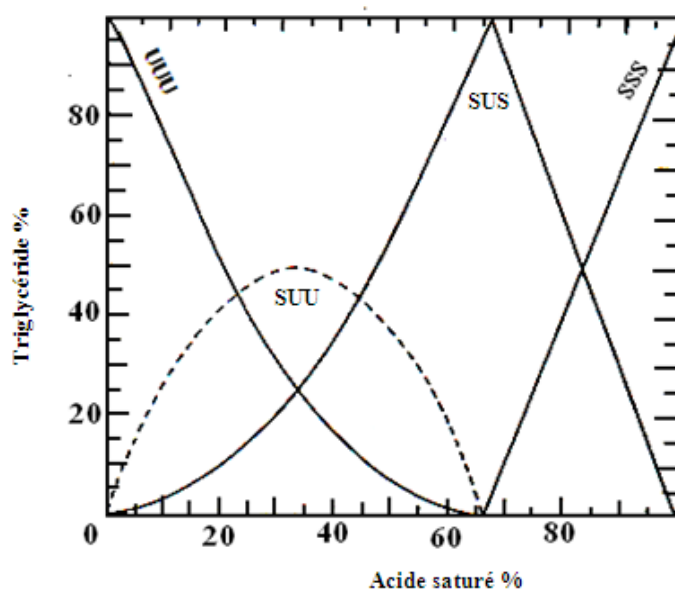


Figure III.2. Composition glycéridique pour la distribution positionnelle (GUNSTONE)

Selon la théorie de distribution de Gunstone, sept TAGs ont été identifiés: LOL, LLL, OOL, LPL, OPL, LStL et Ostl. Les autres TAGs sont minoritaires (moins de 3%). Le contenu de ces TAGs varie d'une façon plus ou moins importante d'un échantillon à un autre. Ainsi, dans l'échantillon 84, la composition quantitative de LOL, LLL, LOO, LPL, OPL, LStL et Ostl représente plus de 83% du total des TAGs, avec une domination de LOL (23%); tandis que, la composition quantitative la plus basse de ces TAGs majeures a été trouvée dans l'échantillon 83 qui représente 52,5% des TAGs totaux. Dans les autres échantillons, les compositions quantitatives des sept principales TAGs montrent un contenu similaire et proche (environ de 70%) des TAGs totaux, avec une domination de LOL (10-23%).

Les composés triglycéridiques des huit échantillons d'huiles des graines de citrouille déterminés par l'utilisation de la méthode de distribution de Coleman sont consignés dans le tableau 3 (Annexe 1). On remarque d'après ces résultats que, les Triglycérides contenant les acides gras ; oléique, linoléique et palmitique représentent plus de 50% de la totalité des triglycérides car ces acides gras

sont les plus majoritaires dans la composition des huiles étudiées ainsi dans la distribution des TAGs. En plus, on remarque que les valeurs calculées des Triglycérides qui contiennent deux chaînes oleoyl et une chaîne linoleoyl (O, O, L) ou une chaîne palmitoyl et deux chaînes oleoyl (P,O,O) sont en accord avec celles calculées à partir des courbes de Gunstone. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans la littérature (yousfi et al., 2005 ; yousfi et al., 2009 ; Charef et al., 2008). Puisque on remarque que les huiles des graines de cucurbitacées habituellement consommées en Congo (*Citrullus lanatus*, *Cucurbita pepo*, *siceraria Lagenaria* et *Cucurbita moschata*) montrent un profile en composition triglycérique similaire par rapport à nos huiles (Mvoula et al., 2008). En conclusion, les acides oléique et linoléique préférentiellement seraient ainsi fixés en position 2. Une telle propriété augmente l'intérêt nutritionnel de cette famille botanique.

D'une façon générale, on peut interpréter les propriétés physiques des huiles par la classification des composés triglycéridiques en groupes selon leur degré d'insaturation. Le tableau III.4 montre les pourcentages des TAGs des quatre grandes catégories de TAGs: trisaturés (GS₃), disaturés (GS₂U), monosaturés (GSU₂) et tri-insaturée (GU₃).

Tableau III.4. Les quatre catégories des triglycérides

		Coleman				Gunstone			
		GS ₃	GS ₂ U	GSU ₂	GU ₃	GS ₃	GS ₂ U	GSU ₂	GU ₃
Huile de graines de citrouille	(Récolte 2008)								
	81	0,01	12,7	45,9	41,3	0,01	12,7	45,9	41,3
	82	0,04	12,5	45,7	41,7	0,03	12,5	45,7	41,7
	83	0,0	26,1	50,0	23,9	0,03	26,1	50,0	23,9
Huile de graines de citrouille	(Récolte 2009)								
	84	0,04	7,80	40,2	52,0	0,04	7,8	40,2	52,0
	91	0,0	11,9	45,2	43,0	0,0	11,9	45,2	43,0
	92	0,0	13,7	46,7	39,6	0,01	13,7	46,6	39,6
	93	0,0	14,4	47,1	38,4	0,01	14,4	47,1	38,4
	94	0,0	16,4	48,2	35,4	0,02	16,2	48,3	35,5

GS₃: Classes des TAG trisaturés; GS₂U: Classes des TAG disaturés;
GSU₂: Classes des TAG monosaturés; GU₃: Classes des TAG tri-insaturés.

Les catégories GS₃, GS₂U, GSU₂ et GU₃ sont détectées dans tous nos échantillons d'huiles étudiées. La contribution de la catégorie GU₂S est également importante lors de l'examen de leurs

propriétés sensorielles à la température ambiante. En conséquence, le rapport entre les quantités des GU_2S et GS_2U dans les échantillons d'huile est sélectivement associé à une augmentation de la fonctionnalité ou l'amélioration de la capacité technologique des attributs sensoriels de cette matière première.

A partir de ces résultats, il est clair que le TAG tripalmitine PPP est le composé majoritaire des triglycérides de la catégorie GS_3 détecté dans les huiles de graines de citrouille. Cette valeur est en accord avec la théorie distribution aléatoire limitée de Kharcha (Yousfi et al., 2009); qui montre que la quantité de GS_3 ne doivent pas dépasser une valeur permise sa solubilité dans le substrat.

Les valeurs de GSU_2 sont rangées entre 7,8 et 26,1%. Ces valeurs sont dûes à ce que les huiles contiennent des proportions faibles en acides gras saturés tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique. Le TAG (PPL) constitue le principal triglycéride de la catégorie de $GU S_2$. Concernant la catégorie GSU_2 , le palmitodilinoïle (PLL) est plus dominant que le palmitidioleïle (POO) car la teneur de l'acide linoléique est plus importante que celle de l'acide oléique dans les échantillons d'huiles. D'une façon générale le taux des triglycérides de la catégorie GSU_2 dans toutes les huiles étudiées est le plus important comparativement aux d'autres catégories. Le total de GU_3 est rangé entre 23,9 et 52,0%. OLL est le plus dominant avec un pourcentage qui s'échelonne de 10,2 et 23,0%, tandis que le TAG trioléine (OOO) est le moins abondant avec un pourcentage qui varie entre 0,4 et 5,4%.

III.1.4. Analyse des Stérols

A partir d'une solution chloroformique de cholestérol de concentration 1mg/ml, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage du cholestérol liant la densité optique en fonction de la concentration (Figure III.3) :

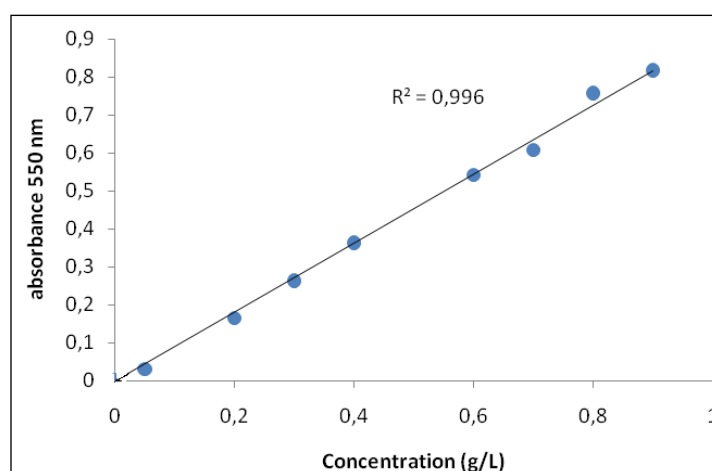


Figure III.3. Courbe d'étalonnage du cholestérol

Les résultats de ce dosage montrent que, les taux des composés stéroliques les plus élevés ont été enregistrés pour les extraits 93, 94 et 81. Tandis que les autres extraits ont montré de faibles teneurs en stérols (Tableau III.5).

Tableau III.5. Quantité des stérols dans les huiles de graines de citrouille

Echantillons	81	82	83	84	91	92	93	94
Concentrations (mg/g)	11,6	3,3	2,13	3,8	3,17	2,26	8,45	8,75

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus montre clairement que les teneurs en huiles dans les échantillons étudiés de cucurbitacée en stérols totaux sont importantes (2,13 à 11,6 mg/g) surtout si on compare ces teneurs à ceux trouvées par Radi (1,6 mg/g) (Radi., 2003) et à ceux trouvés par Hamia (5,058 à 8,45 mg/g) (Hamia., 2007), par contre les valeurs de Charrouf s'échelle entre 1,3 et 2,3mg/g (Charrouf., 1984). Ces résultats, en générale sont beaucoup plus loin de nos valeurs et cela peut-être expliquer aux interférences avec d'autres composés qui possèdent des structures chimiques semblables à la structure stérolique comme les méthyls stérols et les alcools tritérpéniques, la vitamine D, le β -carotène et d'autres composés qui absorbent longueur d'onde de dosage.

III.1.5. Analyse des Tocophérols

La détermination des tocophérols homologues dans les huiles de graines de citrouille est importante en raison de leurs effets antioxydants et leurs influences nutritionnelles positives dans le métabolisme humain comme antioxydants biologiques (Yoshida et al., 2006).

➤ Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Une droite d'étalonnage est tracée à partir d' α -tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g/l (Figure III.4). A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution fille plus 1ml de réactif (Ortho-phenantroline) et 0.5ml FeCl_3 (solutions éthaloniques). Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm.

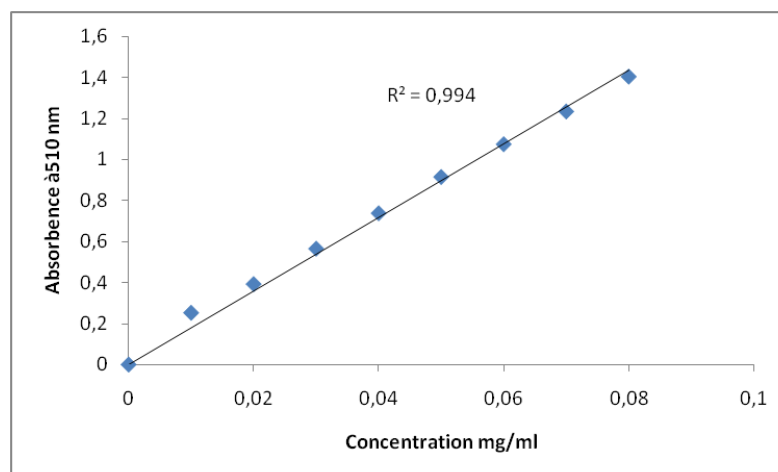


Figure III.4. Courbe d'étalonnage de la vitamine E

Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir de l'huile brute. Les taux des tocophérols totaux dans les échantillons d'huiles ont été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (Figure III.4).

Les résultats de ce dosage sont consignés dans le tableau III.6 :

Tableau III.6. Quantité des tocophérols dans les huiles de graines de citrouille

Echantillons	81	82	83	84	91	92	93	94
Concentrations (mg/kg)	320,2	223	373,3	229,9	324,2	153,4	333,9	380,6

Les taux des composés tocophérolique les plus élevés ont été détectés dans les extraits 83 et 94 (373,3 et 380,6 mg/kg d'huile) respectivement. Tandis que, les teneurs les plus basses sont observées pour les extraits 82 et 92 (223 et 153,4 mg/kg d'huile) respectivement. Les résultats de cette analyse montrent que les échantillons d'huiles étudiées contiennent des quantités moins importantes en tocophérols totaux (la moyenne est 292,32 mg/kg). Ces valeurs comparées aux teneurs en tocophérols des huiles : d'olive (350 mg/kg), de pépins de raisin (700 mg/kg), de maïs (900 mg/kg) (Karleskind., 1992) et à l'huile d'arganier (444,2 à 944,3 mg/kg) (Hamia., 2007), nous amène à conclure que les huiles de citrouille sont relativement riches en tocophérols totaux, ce qui leur confère une importante résistance à l'oxydation et une action vitaminique indéniable.

➤ Quantification de la fraction tocophérolique

L'identification des différents tocophérols présents dans l'huile de graines de citrouille est faite par co-injection des tocophérols étalons standards : α -, β - et δ -tocophérols (Figures 7 et 8, Annexe 1).

Rappelons ici que la colonne à phase inverse ne peut pas séparer les deux isomères β et γ . Un étalonnage externe nous a permis de quantifier chaque tocophérol dans l'huile (Figure III.5).

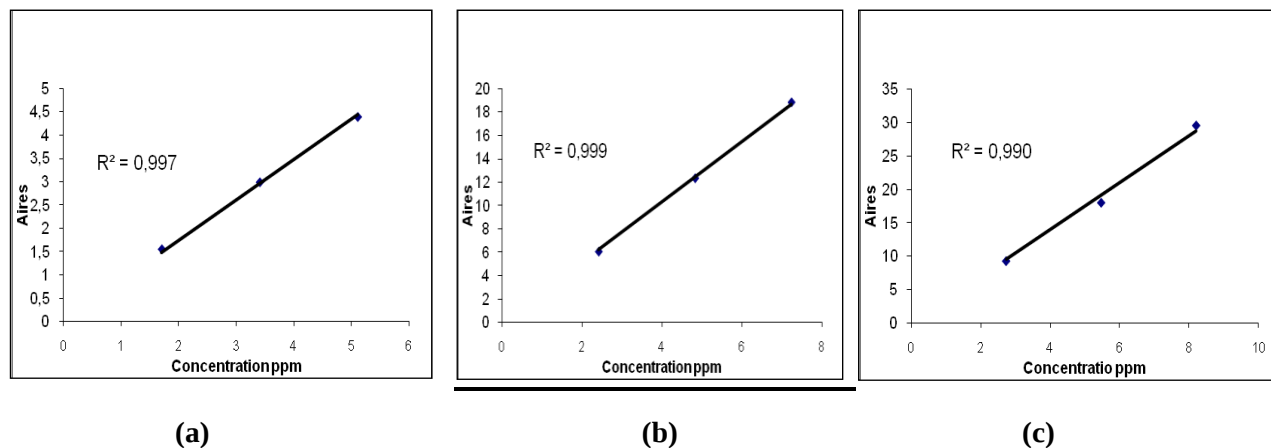


Figure III.5. Courbes d'étalonnages de l' α -tocophérol (a), $(\beta+\gamma)$ -tocophérols (b) et δ -tocophérol (c)

Une courbe moyenne de pic des aires relatives à des concentrations sélectionnées a été ensuite tracée en utilisant un calcul de régression linéaire. Les coefficients de corrélation R^2 étaient proches de 1. Comme le montre le tableau III.7, les huiles de graines de citrouille ont un niveau relativement élevé en tocophérols totaux (104,7 à 221,2 mg / kg d'huile), ce qui serait attendu à contribuer une bonne stabilité oxydative de l'huile pendant le stockage et le traitement.

La teneur totale en tocophérols dans l'huile de graines de citrouille étudiée était relativement plus élevée que celui rapporté dans la littérature (Gemrot et al., 2006 ; Codex Stan., 1999). En outre, l'huile de graines étudiées avait une teneur en tocophérols totaux inférieure à d'autres graines oléagineuses telles, le coton (380-1200 mg / kg d'huile) et le maïs (330-3720 mg / kg d'huile). Cette teneur est supérieure à celle de l'olive (114 mg / kg d'huile), de babassu (60-130 mg / kg d'huile) et de noix de coco (moins de 50 mg / kg d'huile) (Kamal-Eldin and Andersson., 1997 ; Van Niekerk and Burger., 1985 ; Yoshida et al., 1990). Alors qu'il y avait une certaine similitude entre les niveaux de teneur en tocophérols totaux, il y avait une différence dans les quantités des tocophérols individuels séparés. L'analyse des tocophérols en huiles dans les échantillons étudiés de citrouille par CLHP fait apparaître une forte prédominance des isomères $(\beta+\gamma)$ -tocophérol surtout pour les échantillons 81 et 83 avec des teneurs de 155,1 mg/kg et 126,7 mg/kg respectivement à l'exception de l'échantillon 94. L'isomère δ -tocophérol est le deuxième composant majeur (39,1-103,0 mg/kg de teneur en huile) dans tous les échantillons d'huile. L'échantillon 94 est une source riche en δ -tocophérol (103,0 mg/kg d'huile), il représente la teneur la plus élevée comparant aux autres huiles de graines de *Cucurbita pepo* et de ceux d'olive (0 mg/kg d'huile), le maïs (23 mg/kg d'huile) et de

tournesol (0 mg/kg d'huile) (Kamal-Eldin and Andersson., 1997). Si on les compare avec d'autres huiles végétales, comme l'huile d'arachide 360 mg/kg (Yousfi., 2005) et l'huile de l'arganier 1027,8 mg/kg (Yousfi et al., 2009) qui sont connues par leur richesse en tocophérols. On peut dire que les huiles étudiées sont relativement riches en tocophérols.

Les différences observées dans les quantités totales de tocophérols dans les huiles de différents échantillons étaient peut-être due au climat et à la date de collection. Ces résultats provident des informations utiles pour l'application industrielle de ces graines. Des niveaux élevés de δ - tocophérol des huiles, peuvent contribuer à la plus grande stabilité à l'oxydation.

Tableau III.7. Composition en tocophérols individuels dans les huiles de graines de citrouille.

Echantillon	Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)				Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)			
	81	82	83	84	91	92	93	94
α -tocophérol (mg/kg d'huile)	7,7	28,4	29,5	22,6	14,6	22,2	31,9	0,0
(β + γ)-tocophérol (mg/kg d'huile)	155,1	61,1	126,7	39,3	75,5	90,1	46,4	68,0
δ -tocophérol (mg/kg d'huile)	54,8	40,5	56,0	42,7	39,0	53,6	45,0	130,0
Total (mg/kg d'huile)	217,6	130,0	221,2	104,7	129,1	166,0	123,4	170,9

Il faut noter que les valeurs de la teneur en tocophérols totaux trouvée par le dosage colorimétrique (153,4 à 380,6 mg/kg) sont supérieures à ceux déterminées par CLHP. On peut expliquer cette grande différence que la courbe d'étalonnage utilisée lors de la quantification des tocophérols totaux par colorimétrie est réalisée avec l'isomère α -tocophérol alors que l'analyse par CLHP montre que le (β + γ)-tocophérol est le plus dominant dans l'huile de citrouille. Comme la pente de la courbe d'étalonnage dépend de la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'isomère utilisé comme étalon dans le dosage, donc il est tout à fait clair que les valeurs des teneurs en tocophérols totaux ne soient pas les mêmes dans les deux méthodes de quantification. Dans ce cas, nous confirmons que les résultats obtenus par CLHP sont les plus fiables car la détection des tocophérols séparés est faite par fluométrie, technique plus sensible que l'UV.

III.1.6. Classification ascendante et hiérarchique (CAH)

Afin de souligner la corrélation de TAGs et de tocophérols contenus dans les graines de citrouille locale (Algérie) avec des plantes communes (données fournies par la littérature), nous avons choisi la méthode d'analyse de cluster, en utilisant la technique du Ward.

Le résultat se référant à l'analyse des TAGs a montré l'existence de deux pôles principaux (I et II) dans les TAGs des individus des plantes étudiées (Figure III.6). Le cluster groupe (I) regroupe les plantes qui coule: *Gossypium arboreum* (Coton), *Cucumis melo* (Melon), *Cucurbita maxima* (Potiron), *Papaver somniferum* (Pavot somnifère), *Helianthus annuus* (Tournesol) et *Glycine maxima* (Soja). Le second groupe (II) peut être séparé de deux sous-groupes SG-1 et SG-2. Le premier sous-groupe (SG-1) est renvoyé aux plantes suivantes: *Brassica napus* (Colza) et *Olea europaea* (Olive). Le deuxième sous-groupe (SG-2) comprend *Argania spinosa* (Arganier), *Pistacia atlantica* (pistachier de l'Atlas), *Cucurbita pepo*, *Arachis hypogaea* (arachide) et notre *Cucurbita pepo. L* (étudiée). Ces résultats indiquent que nos graines huile sont des plantes des huiles alimentaires.

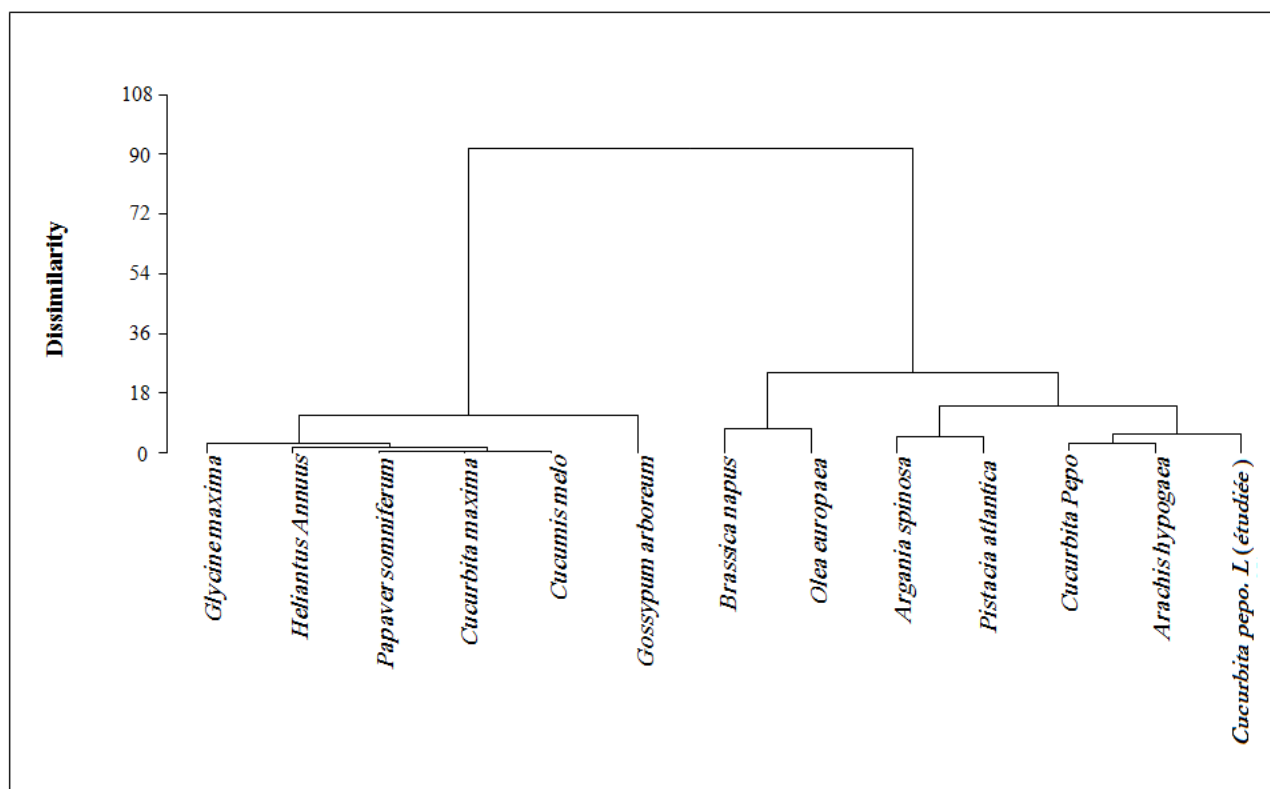


Figure III.6. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) de la composition triglycéridique.

Dans le cas des tocophérols, le dendrogramme de la figure III.7 indique la présence de deux groupes principaux I et II. Le deuxième groupe est divisé en deux sous-groupes SG-1 et SG-2. Le premier groupe est appelé à la grappe des plantes suivantes: *Arachis hypogaea* (arachide), *Gossypium arboreum* (Coton), *Heliantus Annuus* (Tournesol) et *Olea europaea* (Olive). Le deuxième groupe comprend tout le reste des plantes adoptées (inclus des graines de *Cucurbita pepo*). Pour l'analyse de groupement des tocophérols, l'huile de citrouille se trouve entre les deux sous-groupes 1 et 2. Le premier sous-groupe est caractérisé par les teneurs les plus élevées de l' α -tocophérol. La différenciation de la SG-1 et SG-2 est basée sur la différence des trois tocophérols, c.-à-d SG-2 est caractérisé par des teneurs plus élevées en α - et ($\beta + \gamma$)-tocophérol, mais plus faible teneur en δ -tocophérol en comparaison avec SG-1.

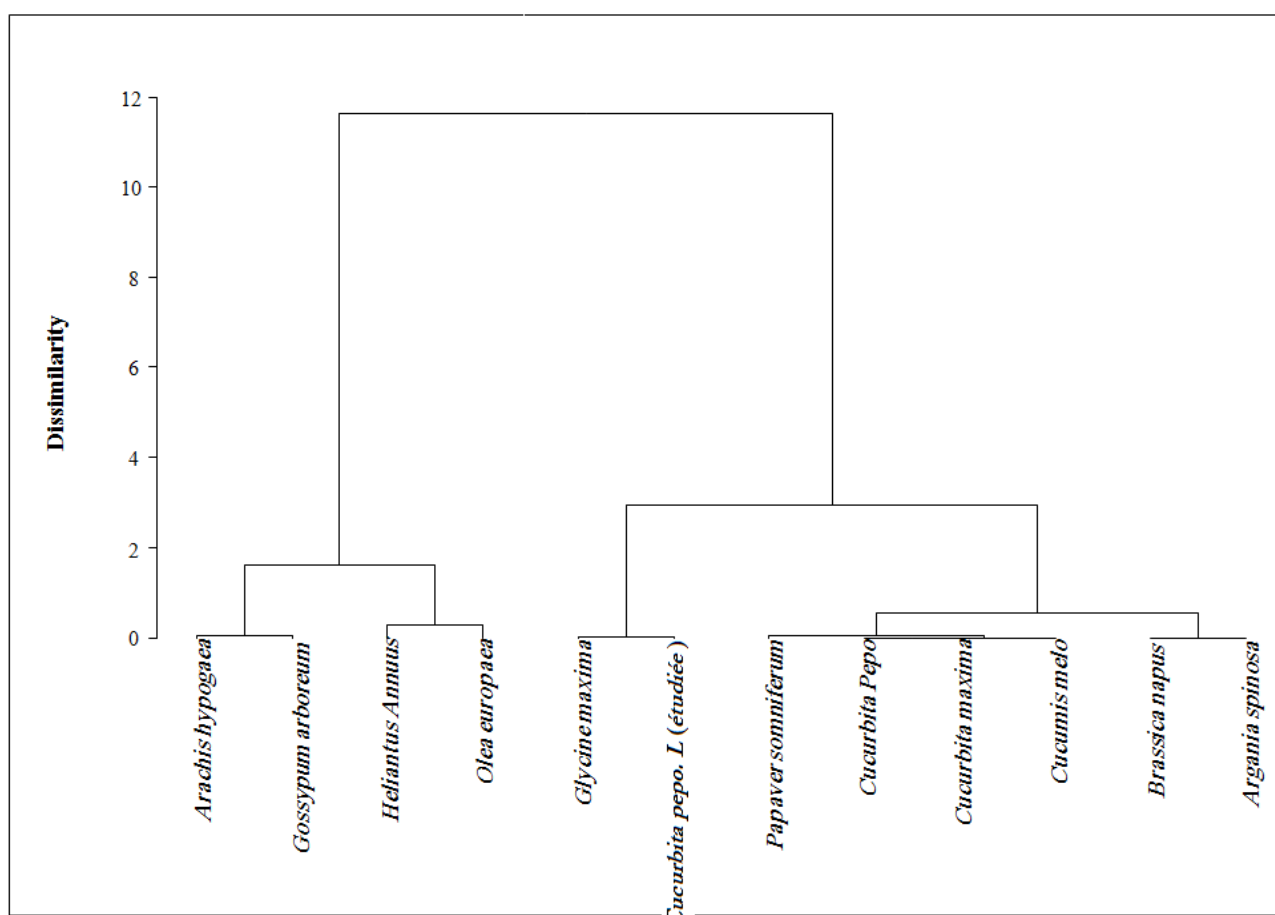


Figure III.7. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) de la composition tocophérolique.

III.2. Extraction et quantification des composées protéiques

III.2.1. Méthode de biuret

La quantité des protéines dans nos extraits a été déterminée à partir la courbe d'étalonnage de l'albumine (Figure III.8)

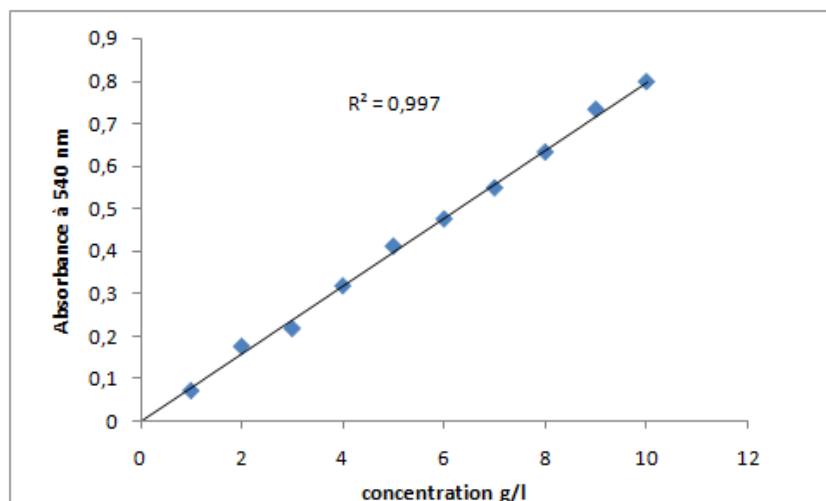


Figure III.8. Courbe d'étalonnage de l'albumine (méthode de Biuret)

L'ensemble des résultats obtenus par cette méthode est regroupé dans le tableau III.8 qui représente les teneurs des protéines en g/100g de tourteaux.

Tableau III.8. Les teneurs des protéines dans les différents extraits (méthode de Biuret)

	Teneur (g/100 g de tourteaux)							
	Récolte de 2008				Récolte de 2009			
	81	82	83	84	91	92	93	94
Albumine	18,102	6,034	6,715	5,742	5,742	9,635	11,386	12,944
Globuline	2,034	6,423	14,987	26,763	21,800	29,878	41,654	42,335
Prolamine	0,291	0,291	0,973	0,194	2,141	1,751	2,822	1,946
Total	20,427	12,748	22,675	32,699	29,683	41,264	55,862	57,225

Les protéines des tourteaux de la graine de citrouille ont été séparées et extraites selon leurs solubilités dans les différents solvants en trois fractions : les albumines qui représentent 5,742 à 18,102 % de tourteaux, les globulines, qui s'intervalent entre 2,034 et 42,335 % et les prolamines, qui varient entre 0,194 et 2,822 % de tourteaux.

Pour les deux récoltes de citrouille, les échantillons présentent des proportions majoritaires en globuline qui varient entre 6,423 et 42,335 %, à l'exception de l'échantillon 81 où lequell l'albumine et le prédominant avec une proportion de 18,102 % de tourteaux. La proportion de la globuline est suivie par la fraction d'albumine qui s'échelonne de 5,742 à 18,102 %. La fraction la moins abondante est celle de la prolamine avec un taux qui varie de 0,194 et 2,822 % de tourteaux.

Dans la récolte de 2009, les quantités des deux fractions Albumine et globuline varient dans le même sens avec des pourcentages différents. La globuline est la fraction majeure (42,335 %) de tourteaux, suivie par l'albumine (12,944 %). Par contre la teneur en prolamine dans cette récolte est élevée au maximum à 2,822 % de tourteaux.

Les teneurs en prolamine dans nos extraits sont très faibles pour les échantillons de l'année 2008, mais par rapport à la récolte de l'année 2009, les teneurs de prolamine sont un peut élevées. Cette variation est peut être due aux conditions climatiques et fructifères de climat.

III.2.2. Méthode de Lowry

En s'appuyant sur la courbe d'étalonnage de l'albumine (Figure III.9), on détermine les teneurs des protéines de huit échantillons dans les tourteaux délipidées.

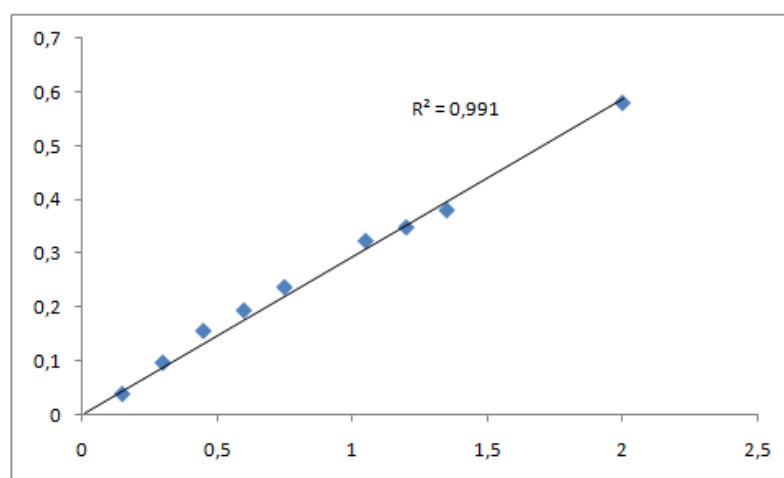


Figure III.9. Courbe d'étalonnage de l'albumine (méthode de Lowry)

L'ensemble des résultats obtenus par cette méthode est regroupé dans le tableau III.9. Les valeurs des teneurs des protéines sont exprimées en g/100g des tourteaux.

Tableau III.9. Les teneurs des protéines dans les différents extraits (méthode de Lowry)

	Teneur (g/100 g de tourteaux)							
	Récolte de 2008				Récolte de 2009			
	81	82	83	84	91	92	93	94
Albumine	2,336	1,299	2,327	1,784	1,456	1,781	1,561	1,962
Globuline	0,265	1,956	2,083	2,108	1,731	1,833	2,265	1,913
Prolamine	0,379	0,327	2,503	2,811	2,447	2,379	3,333	2,308
Total	2,980	3,582	6,913	6,703	5,634	5,993	7,159	6,183

D'après les résultats illustrés dans le tableau III.9, on constate que les teneurs totales des protéines par la méthode de Lowry, sont faibles par rapport aux résultats trouvés en utilisant la méthode de Biuret.

Les valeurs trouvées sont très variables d'un échantillon à un autre et elles sont en fonction de la nature du solvant d'extraction utilisé. La quantité des protéines ne varie pas dans le même sens.

Les teneurs totales en protéines les plus élevées sont enregistrées en faveur des échantillons 83 et 93 avec des taux de 6,913 et 7,159 % de tourteaux respectivement. Un point qui attire l'attention est que les quantités des protéines en prolamine atteint ses valeurs les plus élevées de 2,308 à 3,333 % dans la récolte de l'année 2009. De même pour les échantillons 83 et 84 avec des taux 2,503 et 2,811 % respectivement. Par contre les valeurs les plus basses sont réservées : en globuline (0,265 %) pour l'échantillon 81 et en prolamine avec des teneurs de 0,379 % et 0,327 % pour les échantillons 81 et 82 respectivement.

On remarque que la fraction en albumine est dans le même ordre, autour de 2 % pour les deux récoltes. De même pour l'échantillon 83 concernant les protéines individuelles (autour de 2 %).

Les teneurs totales en protéines dans les graines de citrouille étudiées sont relativement moins élevées que celles rapportées dans la littérature (Hadbaoui., 2012). Toute fois nos résultats sont comparables avec ceux de la littérature, les observations envisagées peuvent être attribuées à des

différentes facteurs tels que ; l'origine géographique, espèce étudiée et les méthodes d'extractions et de dosages.

III.3. Quantification des composées phénoliques

La préparation des extraits phénoliques à partir des graines de citrouille a été effectuée selon la méthode décrite par M.J. Amiot (**Marie-JosBphe Amiot et al., 1986**). L'extraction a été effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange **hydro-acétonique (8/2 V/V)** et un mélange **hydro-alcoolique (8/2 V/V)** pour obtenir initialement l'extrait brut contenant tous les composés extractibles par ces systèmes de solvants y compris les composés phénoliques. Cependant la deuxième étape a été réalisée par une extraction liquide-liquide en utilisant l'acétate d'éthyle, afin de séparer les composés phénoliques de l'extrait brut. De ce fait, huit extraits ont été obtenus. La couleur, l'aspect, la concentration du résidu sec ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids des graines sont représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau III.10).

Tableau III.10. Etat physique et rendement d'extraction des extraits phénoliques

Echantillon	Système d'extraction	Couleur et aspect	Masse (g) du Résidu d'extrait acétate d'éthyle	Rendement d'extraction « % »
81	MeOH/Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,63	1,21
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	10,60	3,53
82	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	5,45	1,81
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	7,90	2,63
83	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	8,88	2,95
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	15,90	5,29
84	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,61	1,20
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	4,90	1,63
91	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,42	1,14
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	2,50	0,83
92	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	2,24	0,74
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,40	1,13
93	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,47	1,15
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	3,10	1,03
94	MeOH/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	4,43	1,47
	Acétone/ Eau	Marron jaunâtre pâteux	17,00	5,65

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que les rendements des extraits du système d'extraction (**MeOH/Eau**) varient de 0,74 à 2,95% où il est constatable que la plus importante quantité du résidu sec a été trouvée dans les graines de l'échantillon 83 comparativement aux autres échantillons et de 0,83 à 5,65% pour les extraits du système d'extraction (**Acétone/Eau**) dont l'extrait de l'échantillon 94 représente le rendement le plus élevé (5,65 %) par rapport au poids total des graines. En revanche, le rendement le plus faible a été enregistré pour l'extrait 91. Donc, les valeurs les plus élevées se sont récupérées dans le système d'extraction (**Acétone/Eau**) par rapport au premier système d'extraction. Ceci, pourrait être expliqué par la nature des composés phénoliques de notre matière végétale.

En comparaison avec d'autres études effectuées sur des graines de cucurbitacées (Attarde et al., 2010), sur le sorgho et de Mil (Hadbaoui., 2012) et sur le *Rhanterium Adpressum* (Hamia., 2015), il apparaît que le rendement de l'extrait brut et de ses fractions par rapport au poids total des graines est légèrement supérieur dans ce présent travail. Les rendements de nos extraits sont comparables à ceux obtenus par d'autres travaux utilisant des mélanges **hydro-méthanolique** (8/2 v/v) et **hydro-acétonique** (8/2 v/v) pour l'extraction des composés phénoliques (Boussoussa et al., 2014). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées. En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération à température ambiante pendant une dizaine d'heures permet d'améliorer le processus d'extraction et de minimiser l'effet de chaleur sur les composés thermosensibles de l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des gaines de citrouille, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des matières végétales sont attribuées à ces substances. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Singleton-Rossi en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme phénol étalon (Figure III.10). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant la catéchine comme standard (Figure III.11).

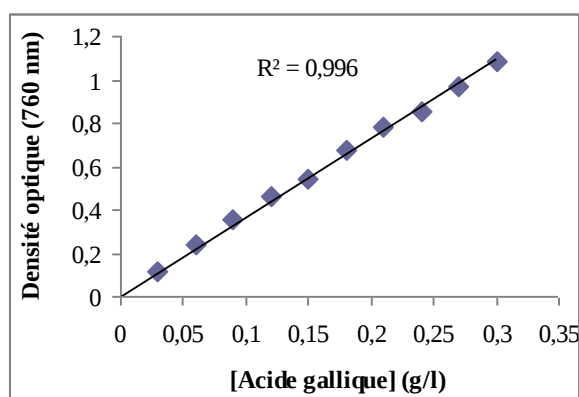


Figure III.10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

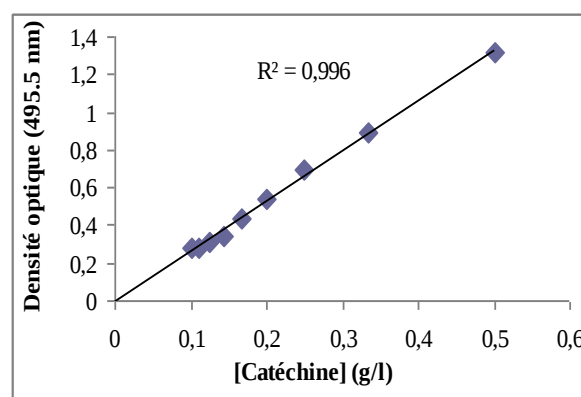


Figure III.11. Courbe d'étalonnage de la catéchine

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par 100 gramme de tourteaux. De même la quantité des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la courbe d'étalonnage de la catéchine et exprimée en milligrammes équivalent en catéchine par 100 gramme de tourteaux. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.11.

Tableau III.11. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différentes graines étudiées

Echantillon	Système d'extraction	Teneur en phénols totaux (mg/100g) équivalent en acide gallique	Teneur en flavonoïdes (mg/100g) équivalent en catéchine
81	MeOH/Eau	35,66	101,33
	Acétone/ Eau	37,81	55,57
82	MeOH/ Eau	34,74	97,14
	Acétone/ Eau	40,44	39,41
83	MeOH/ Eau	37,14	105,90
	Acétone/ Eau	42,93	44,67
84	MeOH/ Eau	38,86	103,35
	Acétone/ Eau	46,39	45,40
91	MeOH/ Eau	29,52	84,16
	Acétone/ Eau	30,87	38,43
92	MeOH/ Eau	19,80	55,51
	Acétone/ Eau	36,65	44,46
93	MeOH/ Eau	26,93	87,20
	Acétone/ Eau	32,96	46,49
94	MeOH/ Eau	34,68	95,23
	Acétone/ Eau	26,68	25,13

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux obtenus par la macération hydro-alcoolique (**MeOH/Eau : 8/2 v/v**), on peut constater que les teneurs de ces composés varient entre 38,86 et 19,8 mg GAE/100 g de tourteaux. Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans les échantillons 84, 83 et 81, tandis que, les teneurs les plus basses sont remarquées dans les échantillons 92, 93 et 91 (Tableau III.11). En outre, nous avons enregistré que les extraits qui ont donné les rendements les plus importants en résidu sec (Tableau III.10) ont offert aussi des teneurs importantes en phénols totaux. Mais si on compare les teneurs en phénols totaux des échantillons 83 et 84 qui sont voisines, on trouve que l'échantillon 83 a fourni un résidu sec deux fois plus supérieur que celui de l'échantillon 84. Une explication simple pourra être retirée de ce résultat, c'est que le résidu de l'échantillon 83 renferme des molécules autres que les composés phénoliques.

On peut noter ici que les échantillons récoltés dans l'année 2008 renferment les quantités en phénols totaux les plus importantes par rapport aux échantillons de l'année 2009. Même remarque a été observé pour les flavonoïdes. Ce résultat pourra être expliqué par le fait que les graines n'ont pas été récoltées dans la même période ou la durée de stockage et la maturité des fruits ont influencé sur la teneur en phénols totaux. Selon, Puuponen Pimia et *al.*, qui ont remarqué qu'un stockage de nombreux légumes qui peut aller jusqu'à une année sera accompagné par une petite diminution des teneurs en polyphénols totaux (**Elvira Gonzalez et al., 2006**). Comparativement aux autres études réalisées sur des échantillons de cucurbitacées (**Savitree et al., 2004**), on peut constater que nos échantillons possèdent des teneurs en phénols totaux relativement importantes.

Cependant, une telle extraction par le méthanol ne donne pas que les polyphénols mais probablement d'autres substances non phénoliques telles que les sucres, les protéines, les pigments et d'autres composés réducteurs qui peuvent interférer pendant le dosage des phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu. Or, l'augmentation du métabolisme phénolique dans certains échantillons étudiés peut être liée aux conditions climatiques (la température élevée, l'exposition au soleil, la sécheresse...).

Il faut noter ici que les valeurs obtenues des teneurs en composés phénoliques totaux ne reflètent pas les quantités réelles de ces substances dans les graines investiguées car il y a plusieurs facteurs qui influent sur le rendement d'extraction en l'occurrence, le type, l'acidité et le volume du solvant, la température et le temps du contact avec la matière première ainsi que le mode d'extraction (**Dopico-García et al., 2007 ; Hayouni et al., 2007 ; Silva et al., 2007 ; Giorgia Spigno et al., 2007**). A cet effet, nous avons choisi dans notre étude deux mélanges **hydro-méthanolique** et **hydro-acétonique** avec

un rapport (8/2) en volume puis une purification par l'acétate d'éthyle qui un bon solvant pour l'extraction des composés phénoliques. Ce choix de cette méthodologie est basé sur une littérature indiquant l'utilisation de ce type de solvants pour extraire les composés phénoliques ayant des activités importantes (Filomena et al., 2007 ; Chirinos et al., 2007 ; Boussoussa et al., 2014).

Dans notre travail, le dosage du contenu en flavonoïdes a été déterminé spectrophotométriquement par la méthode du chlorure d'aluminium qui est utilisée spécifiquement pour la quantification des flavones et flavonols (Kosalec et al., 2004). Par conséquent, les résultats obtenus ne dévoilent pas les quantités des flavonoïdes totales exactes dans les graines investiguées. A cet effet et pour obtenir une estimation proche de ces substances dans ces plantes, il faut utiliser la technique de 2,4-dinitrophénylhydrazine en tant q'une méthode complémentaire pour le dosage des flavanones et dihydrofavonol (Popova et al., 2005). Les valeurs des quantités de flavonoïdes obtenues sont comprises entre 55,51 et 105,9 mg CE/100g de tourteaux. Ces valeurs sont relativement intéressantes par rapport à d'autres résultats obtenus à travers des études réalisées sur le contenu en composés flavonoïdiques du péricarpe du potiron (*Cucurbita maxima*) (Attarde et al., 2010).

Egalement, nous avons remarqué que les teneurs des flavonoïdes dans les extraits sont supérieures à celles des phénols totaux ce qui n'est pas raisonnable. Cette différence pourra être due aux phénols standards utilisés pour la préparation des courbes d'étalonnage ou même aux méthodes choisies pour le dosage. Egalement nous avons représenté la variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (Figure III.12). D'après ce graphe, il est clair qu'il existe une bonne corrélation positive entre la teneur en phénols totaux et le taux des flavonoïdes ($R^2 = 0,92$). Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité des flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en polyphénols d'un échantillon à un autre et que les graines étudiées renferment en général un matériel polyphénolique riche en composés flavonoïdiques.

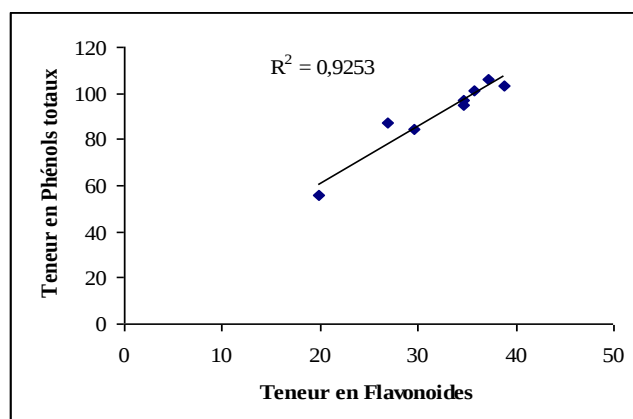


Figure III.12. Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (Système : MeOH/Eau)

On peut noter ici que les graines des échantillons de l'année 2008 présentent presque les mêmes quantités en flavonoïdes par rapport à ceux de l'année 2009. Egalement, on constate que les graines récoltées en 2008 exhibent des teneurs en flavonoïde supérieures à celles de l'année 2009.

D'après les analyses par spectrophotométrie UV-Visible des extraits phénoliques, nous avons pu remarquer que tous les spectres obtenus des huit échantillons présentent les mêmes allures avec des bandes caractéristiques autour de 320 nm avec également la présence d'un épaulement à l'environ de 410 nm. Ces bandes d'absorption sont probablement dues à la présence des anthocyanes ou des isoflavones dans les extraits étudiés (Howard and Gary., 2000).

En fin, la connaissance du matériel polyphénolique des graines des cucurbitacées est encore mal connue. Alors, la mise en évidence des principes actifs issus des métabolites secondaires des végétaux devrait être approfondie afin de permettre d'isoler et de caractériser d'éventuels nouveaux polyphénols ou de trouver des polyphénols déjà connus qui pourront être utilisés pour des études chimiotaxonomiques. A cet effet, le dosage des composés phénoliques par les méthodes spectrophotométriques reste insuffisant et l'analyse quantitative et qualitative de ces substances peuvent être effectuées par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec un détecteur UV-Visible à barette d'iode (Hagen et al., 2007 ; Heimler et al., 2007). En revanche, l'analyse des constituants phénoliques par la CLHP reste encore insuffisante. Il faut donc, passer à la purification des composés par les techniques chromatographiques puis leur identification par les méthodes spectroscopiques (RMN¹H et ¹³C, spectroscopie de masse). Actuellement, l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de masse est devenue une technologie très rapide pour l'identification des composés phénoliques (Romani et al., 1993).

Les résultats obtenus par la macération hydro-acétonique (**Acétone/Eau : 8/2 v/v**) de la teneur en phénols totaux des graines étudiées montrent que ces composés varient entre 26,68 mg et 46,39 mg GAE par 100g de tourteaux. Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans les extraits 84, 83 et 82, tandis que, la teneur la plus basse est observée pour l'extrait de l'échantillon 94.

Le réactif de Folin-Ciocalteu a été choisi pour le dosage des polyphénols pour certaines raisons. Tout d'abord, c'est une technique qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité vu la disponibilité du réactif de Folin-Ciocalteu et la standardisation de la méthode. De plus, la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée. En fin, c'est un test largement pratiqué dans les

laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (Nagavani and Raghava Rao., 2010).

Si le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en oeuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec tous les composés oxydables tel que les acides aminés et les vitamines. De telles interférences peuvent être importante car les graines de cucurbitacées sont riches en vitamines et en protéines est impressionnante, et possèdent également tous les acides aminés essentiels (Attarde et al., 2010).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que les extraits des échantillons de l'année 2008 sont riches en composés flavonoïdiques comparativement aux échantillons récoltés en 2009. Cependant, l'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation faiblement positive ($R^2 = 0,33$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques (Figure III.13). Ceci peut être expliqué par le fait que les composés flavonoïdiques ne représentent pas les composés majoritaires des polyphénols totaux.

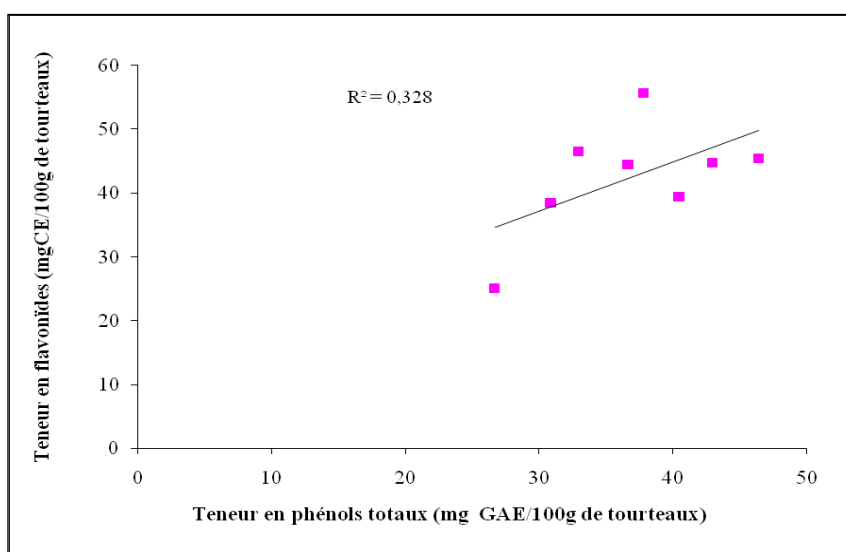


Figure III.13. Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (Système : Acétone/Eau)

Si on compare ces résultats à ceux obtenus par le système de macération hydro-alcoolique (MeOH/Eau : 8/2 v/v), on remarque le même ordre décroissant des extraits en termes de teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. De même, le taux des flavonoïdes dans les deux études est relativement comparable. Toutefois, il est important de signaler que l'utilisation de différents solvants d'extraction, réduit la fiabilité de comparaison entre les deux études. Bien que l'étude des composés phénoliques des graines de cucurbitacées locales soit très peu étudiée, il est relativement difficile de les comparer aux données de la littérature. En effet, il existe une diversité de variétés, de maturité, de conditions climatiques et conditions de stockage des citrouilles et de leur graines, d'une

part et une assez grande variation dans les procédés d'extraction d'autre part, ce qui influent intensivement sur la teneur et la composition chimique des composés phénoliques.

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante

III.4.1. Test de DPPH

Les valeurs d' EC_{50} ont été calculées par la méthode de la régression linéaire des points de pourcentage de l'activité antiradicalaire contre la concentration des composés testés. Le Trolox, l' α -tocophérol, le BHA, le BHT et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des antioxydants de référence (Figure 9, Annexe 1).

Les capacités antioxydantes de nos différents échantillons exprimées en EC_{50} ont été calculées après 30 min de réaction.

La méthode de balayage de radical stable DPPH est une méthode largement utilisée pour évaluer les capacités antioxydantes des produits naturels, il a été utilisé aussi pour l'huile d'olive et d'autres huiles végétales ainsi que des polyphénols antioxydants individuels (Prevc et al., 2013 ; Mancebo-Campos et al., 2014).

III.4.1.1. Test de DPPH des lipides

L'activité est définie par l'indice de la réduction antiradicalaire exprimé en pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations d'extrait lipidique. Donc, l'indice antiradicalaire relatif montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène à l'augmentation de l'activité antioxydante. Ce paramètre a été présenté par Brand-Williams et ses collaborateurs (Brand-Williams et al, 1995 ; Bondet et al, 1997). Il a été employé plus tard par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Tahara., 2007). L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante n'est élevée, plus la valeur d' EC_{50} est inférieure. De ce fait, et pour des raisons de simplicité nous avons introduit le paramètre TAC qui représente la capacité antioxydante totale de l'extrait calculé à partir des valeurs d' EC_{50} . C'est-à-dire, plus les valeurs du TAC est grandes plus le pouvoir antiradicalaire des extraits est important. Les valeurs d' EC_{50} de ce test sont calculées à partir des courbes de la figure III.14.

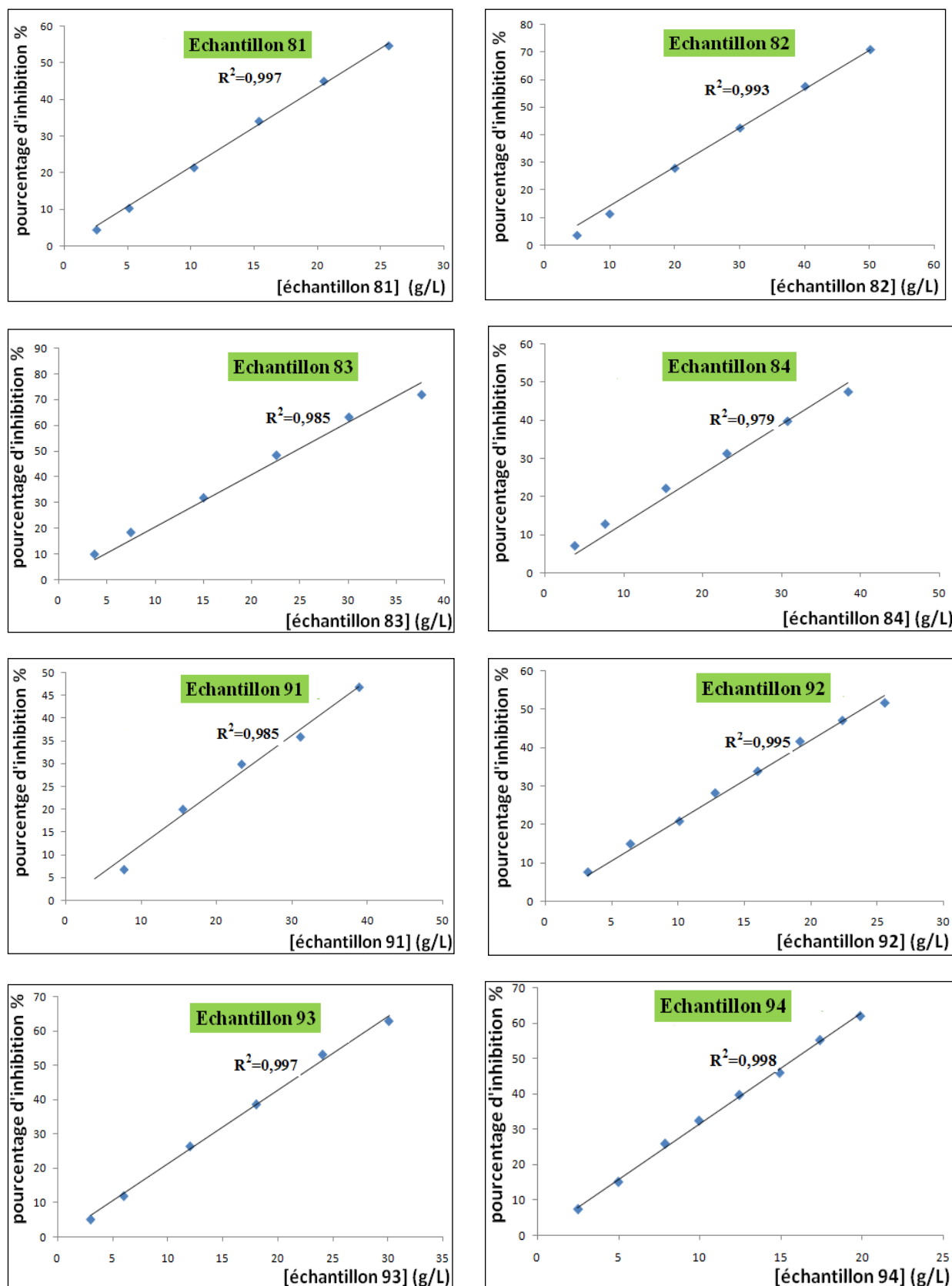


Figure III.14. Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH

Dans le test de DPPH (Figure III.14), tous les extraits d'huile ont montré un effet de balayage du radical DPPH. Les huiles de graines de citrouille sont caractérisées par des différences significatives statistiquement dans leur activité antioxydante mesurée par la méthode du DPPH. Par conséquent, toutes les huiles extraites ont montrées une activité similaire de piégeage des radicaux DPPH. Aucune différence significative de la puissance antiradicalaire a été observée entre les extraits d'huile de graines de citrouille récoltés en 2008 et ceux récoltés en 2009. La plus forte activité antioxydante a été observée par l'extrait obtenu à partir de l'échantillon 94 d'huiles de citrouille. Tandis que, l'échantillon 91 possédait l'activité antiradicalaire la plus basse. Aussi, le tableau III.12 montre la comparaison de la concentration efficace de balayer 50% des radicaux libres (EC_{50}) d'huiles de graines de citrouille contre 250 μ M du radical DPPH. Les valeurs d' EC_{50} des normes qui allaient de 0,005 à 0,01 $g.L^{-1}$ étaient plus fortes que toutes les huiles testées.

Tableau III.12. Les valeurs de l' EC_{50} des différents extraits lipidiques dans le test du DPPH

		EC_{50} (g/L)	TAC (L/g)
Extrait lipidique (récolte 2008)	81	$23,8 \pm 0,08$	0,042
	82	$36,7 \pm 0,18$	0,027
	83	$25,1 \pm 0,07$	0,04
	84	$38,7 \pm 0,2$	0,026
Extrait lipidique (récolte 2009)	91	$41,7 \pm 0,1$	0,024
	92	$27,39 \pm 0,5$	0,036
	93	$22,0 \pm 0,20$	0,045
	94	$17,9 \pm 0,30$	0,056
Vitamine C		$0,009 \pm 0,001$	110,86
Vitamine E		$0,010 \pm 0,002$	95,35
Trolox		$0,005 \pm 0,001$	194,84
BHT		$0,006 \pm 0,001$	164,08
BHA		$0,006 \pm 0,001$	168,52

Beaucoup de recherches ne pouvaient pas trouver de corrélation significative entre la teneur totale des antioxydants et l'activité antioxydante des extraits des plantes. Cela peut être due que les fruits et légumes contiennent beaucoup de différents composants antioxydants, y compris les caroténoïdes, des vitamines, des composés phénoliques, flavonoïdes, etc., ce qui pourrait affecter la mesure de l'activité antioxydante. De plus, dans notre étude, il n'y avait pas de corrélation significative entre l'activité antiradicalaire et le contenu en tocophérols totaux dans les huiles étudiées. Mais, le coefficient de corrélation entre l'activité de piégeage DPPH et le contenu en vitamine E avait $R^2 = 0,2$. Ce résultat suggère que 21% de la capacité antioxydante des huiles de graines de citrouille algériennes résulte de la contribution des composés tocophéroliques. En outre, on peut conclure que l'activité antioxydante des huiles extraites ne se limite pas aux tocophérols, mais il peut aussi provenir de la présence des autres métabolites secondaires. En outre, comme le montre le tableau III.12, la meilleure activité antioxydante a été remarquée par l'huile extraite à partir de l'échantillon 94. Cette huile contient la plus grande quantité de contenu δ -tocophérol. Ainsi, le bon pouvoir antiradicalaire de l'extrait de cette huile peut être dû à la présence de haut teneur en δ -tocophérol.

III.4.1.2. Test de DPPH des protéines

Le principe de la détermination de l'activité antioxydante des extraits protéiques d'albumine et de la globuline (Figure III.15 et Figure III.16) est le même utilisé pour les extraits lipidiques.

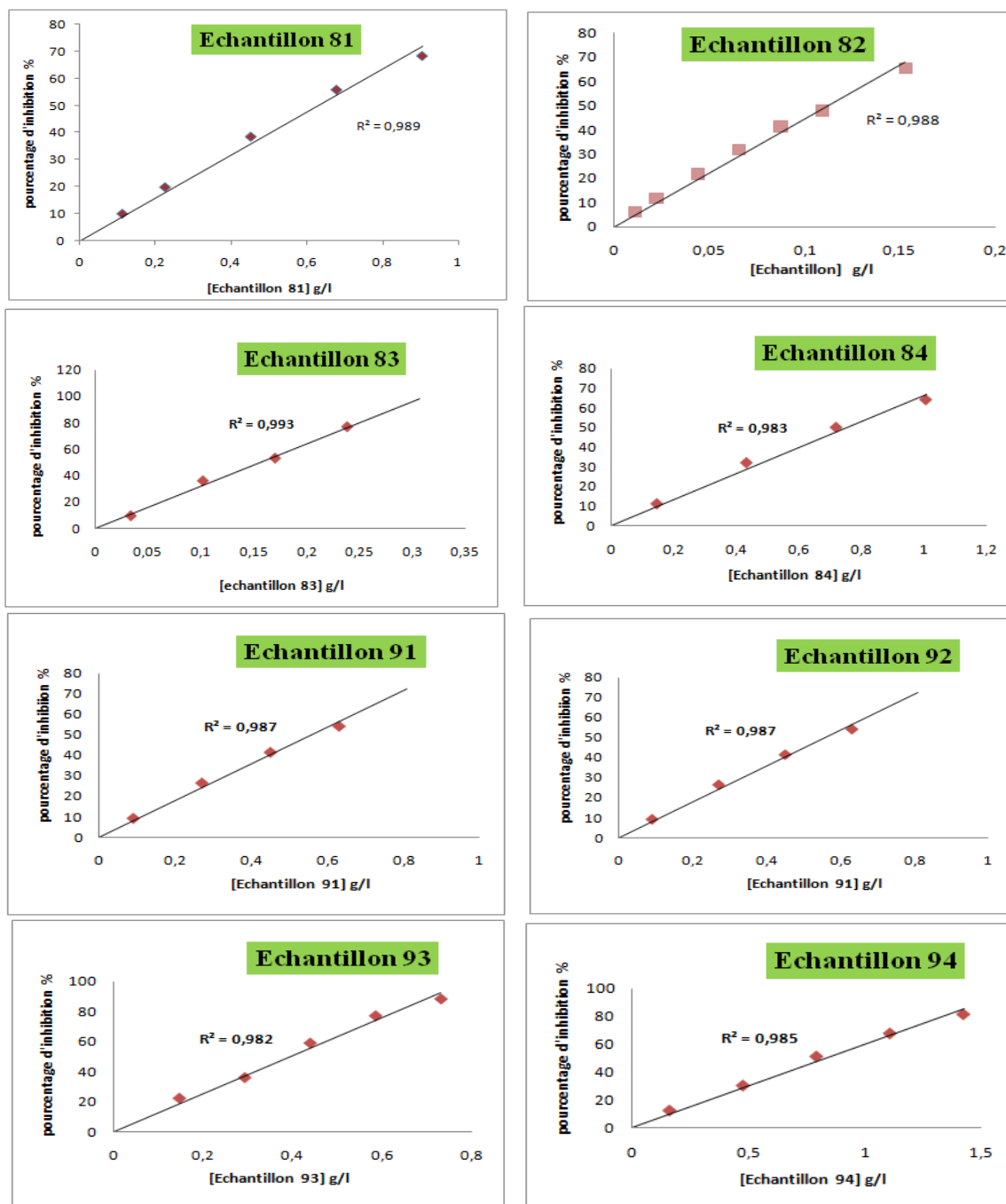


Figure III.15. Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits en albumine dans le test du DPPH

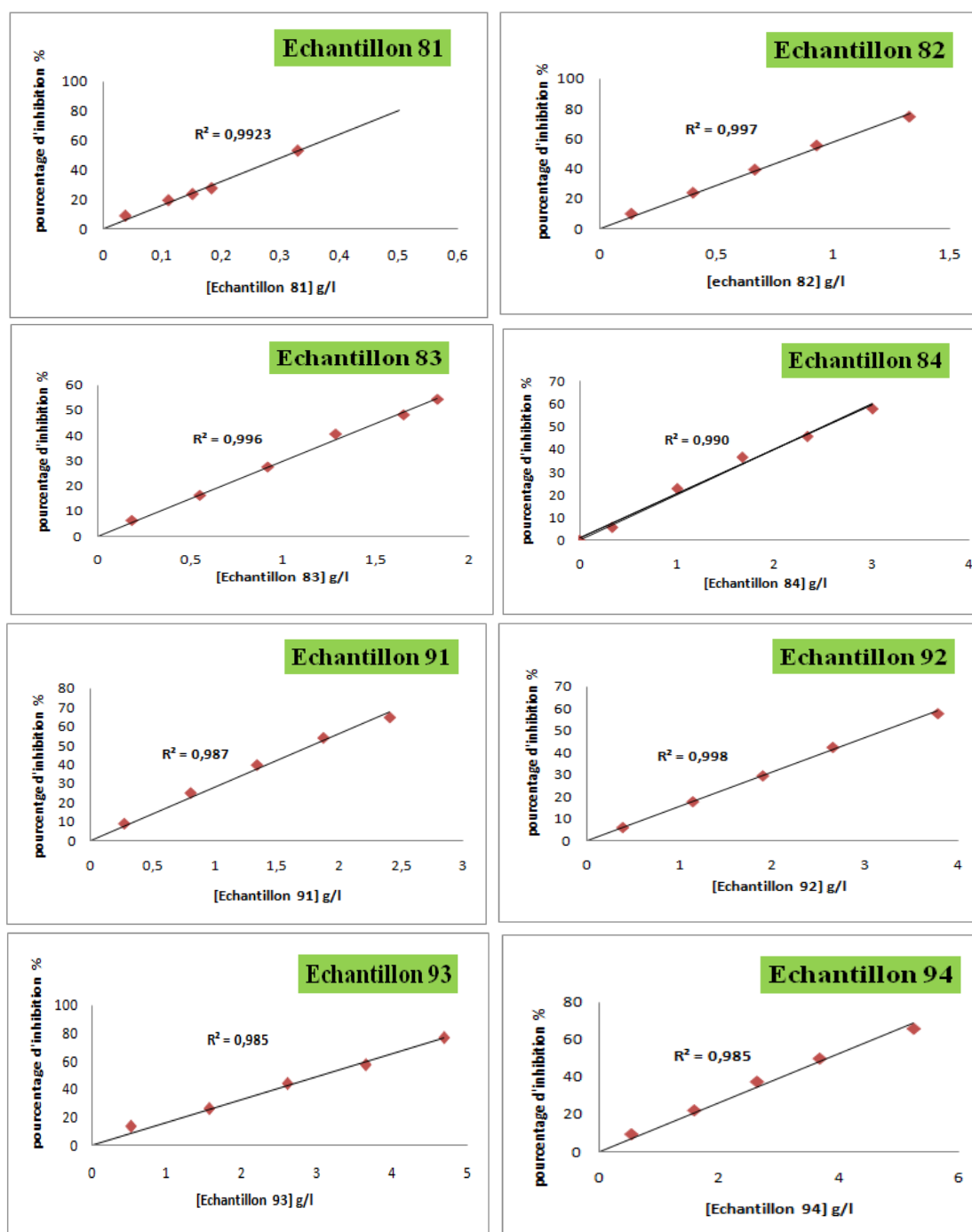


Figure III.16. Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits en Globuline dans le test du DPPH

Le tableau III.13 résume les différents résultats obtenus.

Tableau III.13. Les valeurs d'EC₅₀ des différents extraits d'Albumine et de Globuline dans le test du DPPH

Echantillon	Protéine	EC ₅₀ (g/L)	TAC (L/g)
81	Albumine	0,631 ± 0,016	1,5856
	Globuline	0,309 ± 0,011	3,2320
82	Albumine	0,112 ± 0,005	8,9108
	Globuline	0,862 ± 0,008	1,1600
83	Albumine	0,156 ± 0,004	6,4232
	Globuline	1,666 ± 0,043	0,6000
84	Albumine	0,751 ± 0,035	1,3324
	Globuline	2,502 ± 0,011	0,3400
91	Albumine	0,561 ± 0,019	1,7826
	Globuline	1,78 ± 0,042	0,5620
92	Albumine	0,497 ± 0,042	2,0126
	Globuline	3,209 ± 0,235	0,3120
93	Albumine	0,394 ± 0,017	2,5388
	Globuline	3,064 ± 0,057	0,3260
94	Albumine	0,834 ± 0,042	1,1986
	Globuline	3,802 ± 0,08	0,2630
Vitamine C	/	0,009 ± 0,001	110,86
Vitamine E	/	0,010 ± 0,002	95,350
Trolox	/	0,005 ± 0,001	194,84
BHT	/	0,006 ± 0,001	164,08
BHA	/	0,006 ± 0,001	168,52

La comparaison des activités antiradicalaires obtenues pour les différents extraits protéiques de citrouille révèle que dans l'albumine le pouvoir antiradicalaire varie de 1,1986 au 8,9108 l.g⁻¹. La valeur la plus élevée est observée pour l'extrait 82. Tandis que, l'échantillon 94 a donné un statut antiradicalaire faible. Cependant, nous avons constaté que nos extraits se présentent comme des agents antioxydants relativement puissants par rapport à d'autres extraits de plantes déjà étudiées (Savitree et al., 2004).

Ainsi, la présence de certaines protéines individuelles responsables de cette activité peut influencer sur le pouvoir antiradicalaire. A titre d'exemple, l'extrait de l'échantillon 82 a montré un pouvoir antiradicalaire 7 fois plus grand que celui de l'échantillon 94, malgré que ce dernier possède une teneur en albumine très élevée par rapport l'échantillon 82.

Mais dans le cas de la Globuline on enregistre un pouvoir antiradicalaire allant de 0,263 à 3,2316 L.g⁻¹. La valeur la plus élevée est enregistrée pour l'extrait 81. Tandis que, l'échantillon 94 a donné aussi un statut antiradicalaire faible comme le cas de l'albumine. L'échantillon 81 a montré un pouvoir antiradicalaire 12 fois plus grand que celui de 94, malgré que l'échantillon 94 possède aussi une teneur en globuline très élevée par rapport à l'échantillon 81. En ce qui concerne les extraits de prolamine, nous avons remarqué que tous les échantillons étudiés possèdent des statuts antiradicaux faibles avec ces faibles concentrations.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence. A cet effet, nous avons utilisé l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le BHT, le BHA et le Trolox comme contrôles positifs doués des activités antioxydantes très importantes (Traber et Atkinson, 2007 ; Takebayashi et al., 2010). Ces antioxydants sont utilisés comme des agents conservateurs dans les industries agroalimentaires. La capacité antiradicalaire de ces références a été calculée à partir des tracées figurant la variation de leurs taux d'inhibitions en fonction de leurs concentrations (Figure 9, Annexe 1). D'après les valeurs obtenues d'EC₅₀, on aperçoit que tous antioxydants testés découvrent des activités antiradicales semblables. Mais comparativement aux extraits, il est clair que ces antioxydants de référence ont un statut antiradicalaire très élevé.

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits d'albumine testés s'avèrent moins actifs que les antioxydants de référence et qui exhibent presque le même statut antioxydant. Le BHT et BHA et Trolox, sont 19 fois plus actifs que l'extrait 82. De même, dans l'extrait de la globuline 81 est 55 fois moins actifs que le BHT et BHA et Trolox.

Les capacités de piégeage du radical DPPH^{*} des différents extraits de la Globuline et les standards de référence sont classées dans l'ordre suivant : Trolox > BHA > BHT > Vit C > Vit E > 81 > 82 > 83 > 91 > 84 > 93 > 92 > 94. Et pour les extraits de l'albumine : Trolox > BHA > BHT > Vit C > Vit E > 82 > 83 > 93 > 92 > 91 > 81 > 84 > 94. La comparaison de ces valeurs obtenues avec celles enregistrées par les extraits des échantillons testés, nous a permis de conclure que nos échantillons sont moins actifs que les antioxydants standards.

Bien que le test au DPPH^{*} soit considéré comme une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre, les expériences ont montré certaines difficultés de la mesure. C'est pourquoi, en effectuant des tests de mesure de la cinétique de l'activité antiradicalaire, on peut générer une évaluation plus globale des propriétés des échantillons étudiés. L'estimation simultanée du pouvoir antiradicalaire TAC et du temps de réaction permettraient d'estimer d'une meilleure façon l'activité antioxydante

par l'indice de l'efficacité antiradicalaire. Le test du DPPH n'est pas quantitatif, il permet de comparer les différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le radical DPPH[•] et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés protéiques. L'évaluation de l'activité antiradicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH[•] à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant. La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à balayer les radicaux libres. Des effets synergiques peuvent être modélisés l'activité antiradicalaire. Néanmoins, les observations obtenues sur la simple estimation des activités des composés purs et extraits, ouvrent le cadre à la recherche des explications authentiques de ces résultats par une étude chimique approfondie des principes actifs des extraits potentiels et par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels.

III.4.1.3. Test de DPPH des polyphénols

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction antiradicalaire exprimé en pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations d'extrait (Figure III.17) concernant le système de macération hydro-alcoolique (**MeOH/Eau : 8/2 v/v**) et (Figure III.18) pour le système de macération hydro-acétonique (**Acétone/Eau : 8/2 v/v**). Et comme il n'existe pas de mesure absolue et significative de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent comparés par rapport aux antioxydants de référence.

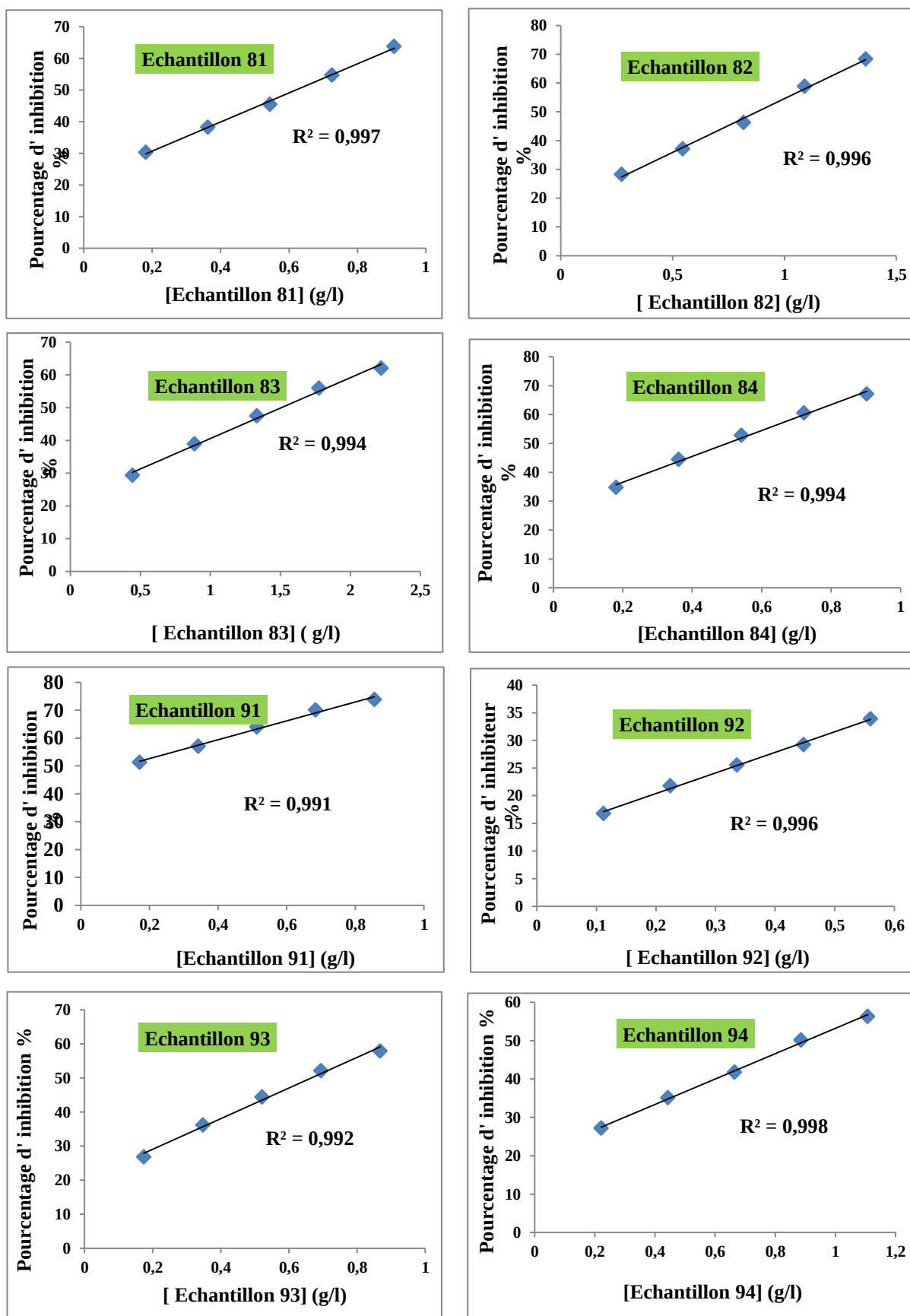


Figure III.17. Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques (**Système : MeOH/Eau**) dans le test du DPPH

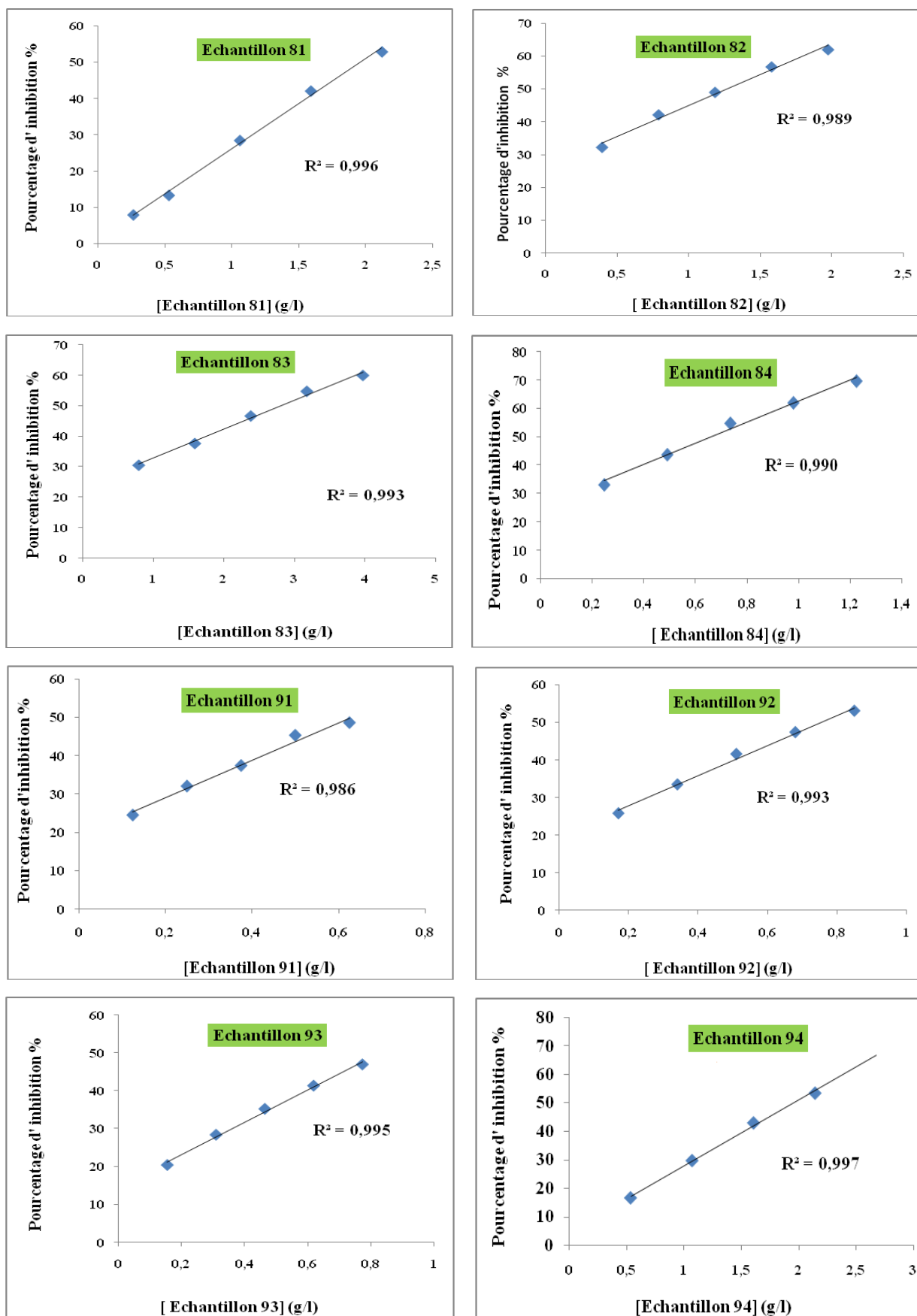


Figure III.18. Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques (**Système : Acétone/Eau**) dans le test du DPPH

Le tableau III.14 résume les différents résultats obtenus.

Tableau III.14. Les valeurs d'EC₅₀ et du TAC des différents extraits phénoliques dans le test du DPPH

Echantillon	Système d'extraction	EC ₅₀ (g/l)	TAC (l/g)
81	MeOH/Eau	0,615 ± 0,09	1,62
	Acétone/ Eau	1,970 ± 0,14	0,51
82	MeOH/ Eau	0,881 ± 0,08	1,13
	Acétone/ Eau	1,298 ± 0,02	0,77
83	MeOH/ Eau	1,510 ± 0,03	0,66
	Acétone/ Eau	2,815 ± 0,02	0,35
84	MeOH/ Eau	0,502 ± 0,09	1,99
	Acétone/ Eau	0,658 ± 0,03	1,52
91	MeOH/ Eau	0,120 ± 0,07	8,33
	Acétone/ Eau	0,628 ± 0,02	1,59
92	MeOH/ Eau	1,002 ± 0,10	1,00
	Acétone/ Eau	0,752 ± 0,003	1,33
93	MeOH/ Eau	0,663 ± 0,06	1,51
	Acétone/ Eau	0,830 ± 0,03	1,20
94	MeOH/ Eau	0,908 ± 0,09	1,10
	Acétone/ Eau	1,942 ± 0,05	0,51
Vitamine C	/	0,009 ± 0,001	110,86
Vitamine E	/	0,010 ± 0,002	95,35
Trolox	/	0,005 ± 0,001	194,84
BHT	/	0,006 ± 0,001	164,08
BHA	/	0,006 ± 0,001	168,52

A la lumière des résultats obtenus de ce screening, on peut remarquer que les extraits phénoliques obtenus par la macération hydro-alcoolique (**MeOH/Eau : 8/2 v/v**) des différents échantillons ont affiché un pouvoir antiradicalaire allant de 0,66 au 8,33 g⁻¹.l. La valeur la plus élevée est observée pour l'extrait 91. Tandis que, l'échantillon 83 a donné un statut antiradicalaire faible. Cependant, nous avons constaté que nos extraits se présentent comme des agents antioxydants relativement puissants par rapport à d'autres extraits de cucurbitacées déjà étudiées (Savitree et al., 2004).

On a essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs de TAC et les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et même en résidu sec, mais on a obtenu des coefficients de corrélation très faible ($R^2 < 0,1$). La seule explication de cette indépendance est que les compositions des extraits en polyphénols et flavonoïdes sont différentes. Ainsi, l'existence de certaines molécules

individuelles responsables de cette activité peut influencer sur le pouvoir antiradicalaire. A titre d'exemple, l'extrait de l'échantillon 91 a montré un pouvoir antiradicalaire 8 fois plus grand que celui de l'échantillon 93, malgré qu'ils renferment les mêmes teneurs en composés phénoliques. Par ailleurs, tous les extraits sauf 91 présentent des EC_{50} voisin dont leurs teneurs en composés phénoliques sont différentes. De plus, Egalement, nous avons enregistré une très bonne corrélation linéaire entre les valeurs d' EC_{50} et le rendement d'extraction pour les extraits des échantillons de l'année 2008 ($R^2 = 0,99$).

D'après les valeurs obtenues d' EC_{50} , on remarque que tous les antioxydants testés ont des activités antiradicalaires semblables. Mais comparativement aux extraits, il est clair que ces antioxydants de référence ont un statut antiradicalaire très élevé.

Les valeurs d' EC_{50} des extraits obtenus par la macération hydro-acétonique (**Acétone/Eau : 8/2 v/v**) à travers ce screening antiradicalaire sont indiquées dans le tableau III.14. Comme figurant dans le tableau ci-dessus, on constate que les valeurs de TAC de tous les extraits sont significatives mais faibles. Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante au élevé. Egalement, nous avons enregistré un statut antiradicalaire très intéressant pour les antioxydants de référence. En effet, le trolox est le piègeur du radical DPPH $\cdot$ le plus puissant parmi les cinq standards utilisés.

Les capacités de piégeage du radical DPPH $\cdot$ des différents extraits et standards sont classées dans l'ordre suivant : Trolox > BHA > BHT > Vit C > Vit E > 94 > 91 > 84 > 92 > 93 > 82 > 81 > 83. Néanmoins, les extraits 94, 91 et 84 possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH les plus intéressantes, puisqu'ils agissent à faible dose, mais reste significativement inférieure à celle des témoins. Toutefois, les antioxydants standards sont 200 fois plus actifs que nos extraits. Cette faible action inhibitrice du radical DPPH $\cdot$ peut être expliquée par la présence d'un taux relativement bas d'antioxydants individuels dans les extraits phénoliques investigués.

D'autre part, aucune dépendance significative n'a été trouvée entre le pouvoir antiradicalaire exprimé en EC_{50} et les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes ($R^2 < 0,01$) des extraits. Par contre, une bonne corrélation positive ($R^2 = 0,85$) a été détectée entre les valeurs d' EC_{50} et le rendement du résidu sec (Figure III.19). En revanche, cette corrélation linéaire sera très significative ($R^2 = 0,99$; Figure. 11, anexe 1) si les valeurs d' EC_{50} seront dessinées en fonction des rendements d'extraction des composés phénoliques que pour les extraits de l'année 2008.

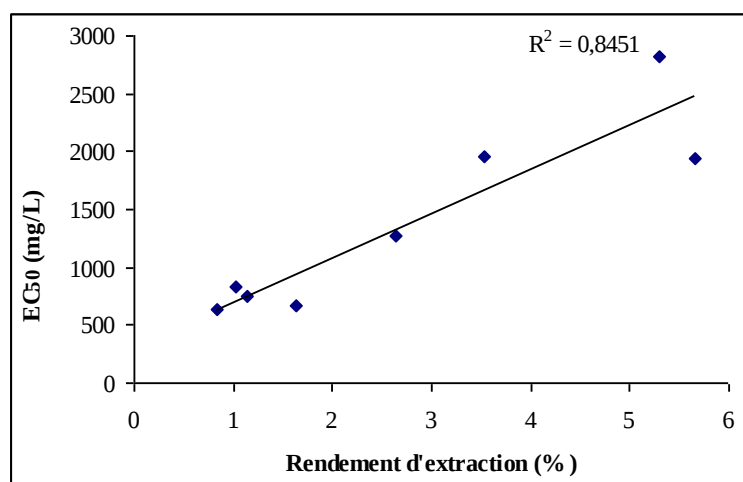


Figure III.19. Courbe de variation des valeurs d'EC₅₀ du test du DPPH en fonction du rendement d'extraction (**Système : Acétone/Eau**)

Cette bonne dépendance, décrit que l'efficacité antiradicalaire des extraits varie inversement avec le taux d'extraction. C'est-à-dire, plus la masse du résidu sec obtenue est élevée plus l'activité antiradicalaire est importante. Une explication possible de ce résultat peut être retirée, par le fait que les extraits possédant une activité réductrice du DPPH[•] importante peuvent renfermer que des molécules antioxydantes. En revanche, les extrais donnant ainsi un bon rendement d'extraction peuvent contenir des composés neutres qui influent sur la concentration sans qu'ils contribuent à l'activité antioxydante.

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire d'une façon plus pertinente, une approche introduit des paramètres cinétiques, tels que le temps TEC₅₀, la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique, sera nécessaire pour atteindre l'équilibre et donne une estimation plus en moins précise de la valeur d'EC₅₀ sera calculée (**Djeridane., 2008**). L'estimation du temps TEC₅₀ permet d'introduire la classification suivante: TEC₅₀ < 5 min (réaction rapide), 5,30 min (réaction intermédiaire) et TCE₅₀ > 30 min (réaction lente) (**Djeridane., 2008**). L'indice de l'efficacité antiradicalaire relie la concentration du DPPH[•] et le temps TEC₅₀ dans l'essai avec la concentration effective EC₅₀ de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait.

III.4.2. Test du phosphomolybdate (PPM)

La méthode de phosphomolybdène est couramment appliquée pour évaluer la capacité antioxydante totale des extraits de plantes et de diverses variétés de graines (Hadbaoui et *al.*, 2010 ; Bagepalli et *al.*, 2010). Cette méthode est basée sur la réduction de molybdène (VI) par les antioxydants et la formation d'un complexe vert molybdène (V), qui absorbe à 695 nm.

De même, comme dans le test du DPPH, les valeurs d'EC₅₀ ont été calculées par la méthode de la régression linéaire des points de pourcentage du pouvoir réducteur contre la concentration des extraits testés. Le Trolox, l' α -tocophérol, le BHA, le BHT et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des antioxydants de référence (Figure 10, Annexe 1).

III.4.2.1. Test du phosphomolybdate des lipides

Les valeurs des activités antioxydantes totales sont calculées à partir des courbes figurant la variation du pourcentage de réduction des antioxydants en fonction de leurs concentrations exprimées en g.L⁻¹ (Figure III.20).

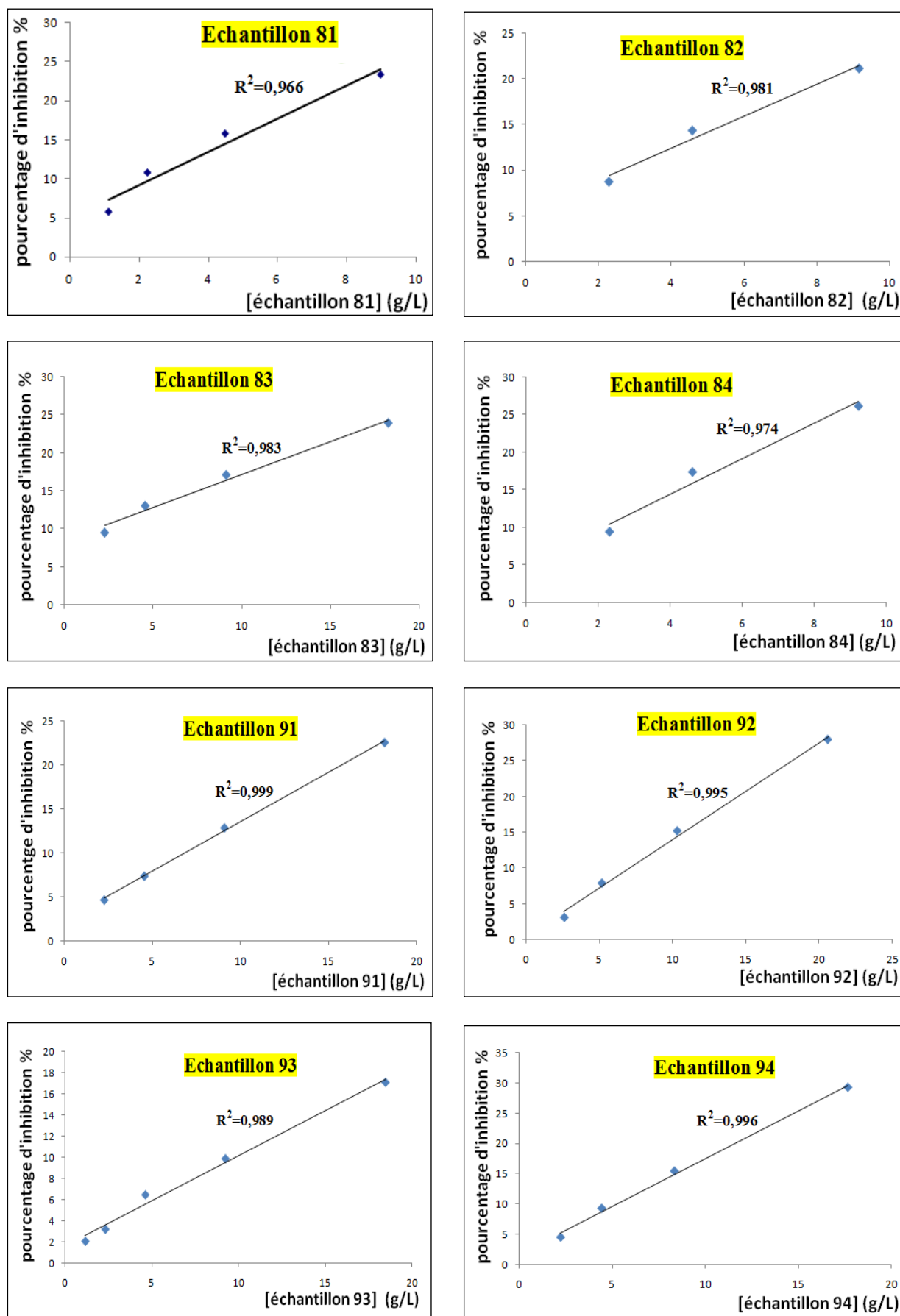


Figure III.20. Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du PPM

Les capacités antioxydantes totales observées dans toutes les huiles extraites ont des valeurs d'EC₅₀ qui s'échelonnent de $18,8 \pm 0,3$ à $56,3 \pm 0,2$ g / l (Tableau III.15). Toutes les huiles extraites ont des activités plus faibles comparativement aux antioxydants standards. La capacité antioxydante la plus élevée a été révélée pour l'échantillon 84. Son effet était presque cinq fois moins que le BHT. Cet antioxydant est actuellement utilisé dans l'industrie alimentaire et dans la thérapie, mais il est accusé d'être dangereux pour la santé (Hocman. G., 1988). Donc, les résultats suggèrent que nos extraits des huiles en particulier l'échantillon 84 peuvent remplacer les antioxydants synthétiques parce qu'ils constituent une bonne activité antioxydante à ceux observés pour l'antioxydant de référence. Comparant ces résultats avec la littérature, des valeurs similaires ont été signalées pour l'huile de graines de citrouille de la Pologne (Siger et al., 2008). Cependant, nos extraits d'huile de citrouille ont illustré de bonnes activités antiradicalaires comparativement à d'autres huiles telles que le soja et le tournesol (Siger et al., 2008).

Tableau III.15. Les valeurs de l'EC₅₀ des différents extraits lipidiques dans le test du PPM

		EC ₅₀ (g/L)	TAC (L/g)
Extrait lipidique (Récolte 2008)	81	$20,6 \pm 0,9$	0,048
	82	$24,4 \pm 0,14$	0,041
	83	$45,5 \pm 0,31$	0,022
	84	$18,8 \pm 0,3$	0,053
Extrait lipidique (récolte 2009)	91	$39,8 \pm 0,39$	0,025
	92	$41,5 \pm 0,75$	0,024
	93	$56,3 \pm 0,2$	0,018
	94	$31,1 \pm 0,6$	0,032
Vitamine C		$0,07 \pm 0,001$	14,28
Vitamine E		$0,08 \pm 0,001$	12,50
Trolox		$0,07 \pm 0,001$	14,28
BHT		$3,60 \pm 0,002$	0,28
BHA		$0,27 \pm 0,005$	3,70

En outre, il n'y avait pas de relation entre l'activité antioxydante totale évaluée par le test DPPH et les activités réductrices ($R^2 < 0,40$). Aussi, une mauvaise corrélation a été observée entre l'activité antioxydante et le taux de teneur en α -tocophérol ($R^2 \approx 0,50$). On peut expliquer ces résultats, on

considérant que la propriété antioxydante globale d'un extrait de plante est généralement le résultat de l'activité combinée d'une large gamme de composés comprenant, à côté de composés phénoliques, des peptides, des acides organiques et d'autres composants (Gallardo et al., 2006). Ceci est la raison pour laquelle les échantillons tels que 82 et 93 ayant des concentrations proches en tocophérols totaux, peuvent varier dans leurs activités antioxydantes (Test PPM). Il peut être observé que les activités antioxydantes des extraits des huiles n'ont pas de corrélation significative avec leur activité antiradicalaire mesurée par le test DPPH ($R^2 < 0,1$). L'écart entre les résultats des tests DPPH et PPM peut être liée aux différents mécanismes impliqués dans chaque évaluation. En conclusion, nos résultats suggèrent que les extraits d'huile de certaines graines de citrouille étudiées ont une capacité antiradicalaire. La réintroduction des graines de la citrouille dans le régime alimentaire normal est acceptable et pourrait être une pratique culturelle pertinente dans le contrôle des maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

Les données sur la teneur d'huile de graines des cucurbitacées sont très importantes pour les nutritionnistes, les médecins, les industries et les consommateurs, comparativement à l'huile d'olive de la Méditerranée. Bien que diverses méthodes ont été mises au point pour l'évaluation quantitative de différents composés antioxydants dans les huiles comestibles. Ainsi, l'huile de graines de *cucurbita pepo* pourrait être une alternative à l'huile d'olive (Tsaknis et al., 1997 ; Kalogeropoulos and Tsimidou., 2014).

III.4.2.2. Test du phosphomolybdate des protéines

Les valeurs des activités antioxydant totales sont calculées à partir des courbes figurant la variation du pourcentage de réduction des extraits protéiques en fonction de leurs concentrations exprimées en g/L (Figure III.21 et Figure III.22).

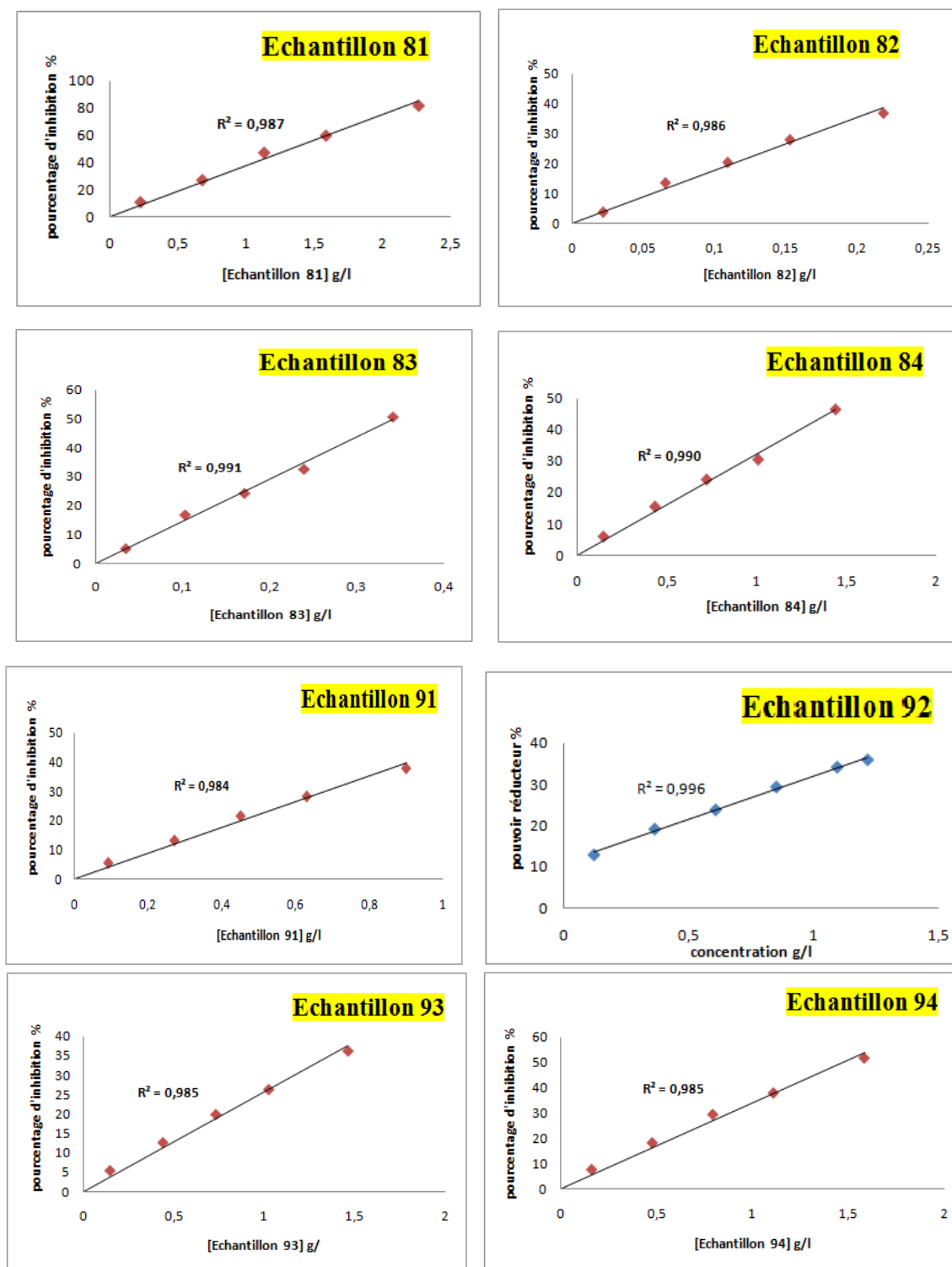


Figure III.21. Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits en albumine dans le test du PPM

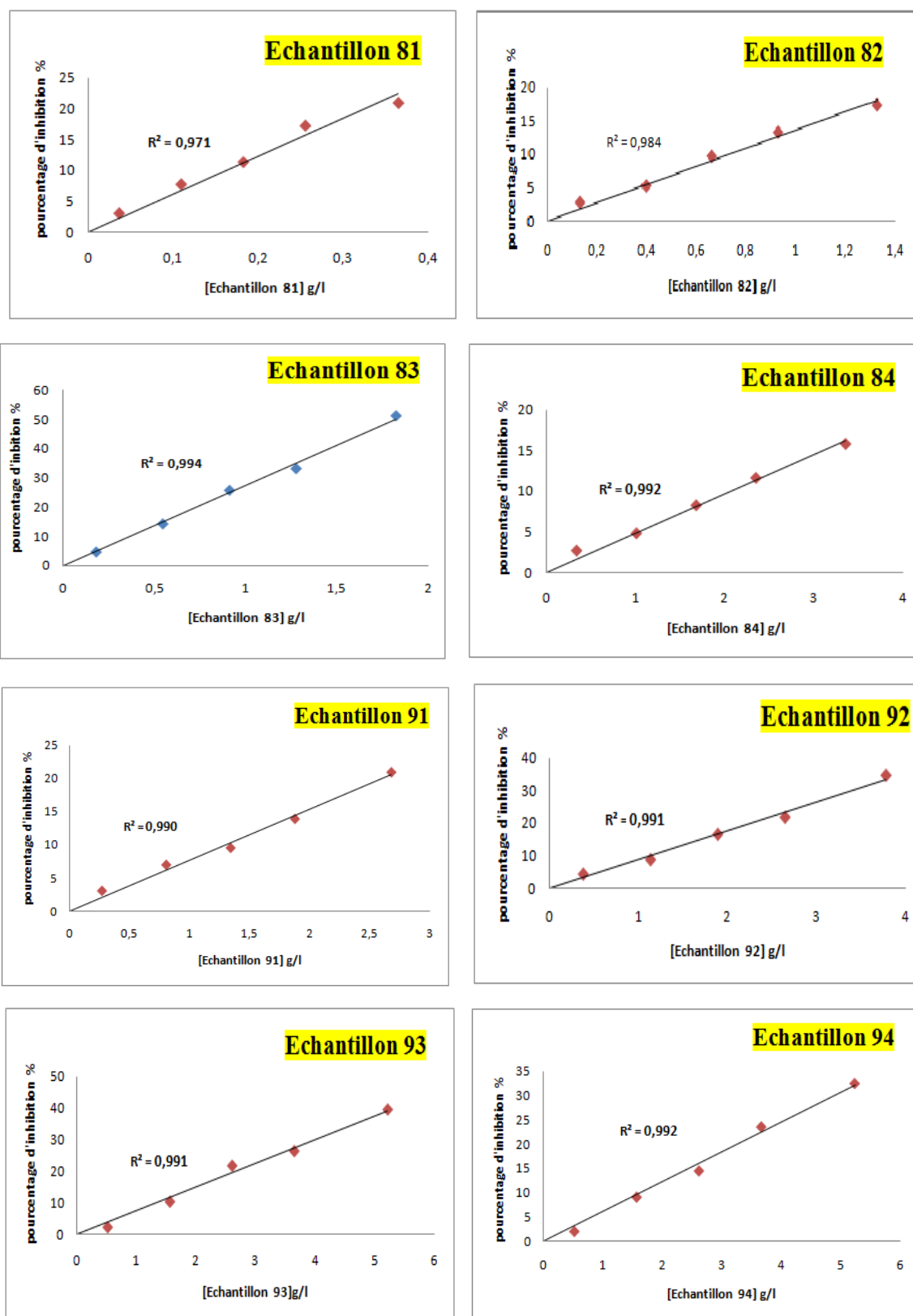


Figure III.22. Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits en globuline dans le test du PPM

Les valeurs obtenues d'EC₅₀ (concentration effective à 50%) et du TAC (Total Antioxydant Capacity) sont mentionnées dans le tableau III.16. De même, les extraits de la prolamine, possèdent des pouvoirs réducteurs très faibles dans tous les échantillons étudiés avec ces faibles concentrations.

Les valeurs de l'activité antioxydante obtenues révèlent que les graines de citrouille possèdent une activité réductrices dose dépendante, les EC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées. L'ensemble des extraits étudiés révèle des propriétés antioxydantes moyennement intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs d'EC₅₀. Ainsi, nous remarquons que les valeurs obtenus pour l'albumine varient entre 0,2829 et 1,9450 g.L⁻¹ pour les extraits des échantillons 82 et 93 respectivement.

Tableau III.16. Les valeurs d'EC₅₀ des différents extraits d'Albumine et de Globuline dans le test du PPM

Echantillon	Protéine	EC ₅₀ (g.L ⁻¹)	TAC (L.g ⁻¹)
81	Albumine	1,334 ± 0,0050	0,7498
	Globuline	0,8539 ± 0,022	1,1710
82	Albumine	0,283 ± 0,0000	3,5344
	Globuline	3,684 ± 0,1521	0,2715
83	Albumine	0,343 ± 0,0110	2,9126
	Globuline	1,8288 ± 0,025	0,5468
84	Albumine	1,5495 ± 0,033	0,6454
	Globuline	10,36 ± 0,1536	0,0965
91	Albumine	1,1339 ± 0,08	0,8819
	Globuline	6,5246 ± 0,1153	0,1532
92	Albumine	1,8662 ± 0,0000	0,5358
	Globuline	5,6794 ± 0,2347	0,1760
93	Albumine	1,945 ± 0,1528	0,5141
	Globuline	6,6636 ± 0,3503	0,1500
94	Albumine	1,4717 ± 0,034	0,6795
	Globuline	8,1390 ± 0,0385	0,1229
Vitamine C	/	0,07 ± 0,001	14,28
Vitamine E	/	0,08 ± 0,001	10,00
Trolox	/	0,07 ± 0,001	12,50
BHT	/	3,60 ± 0,002	0,28
BHA	/	0,27 ± 0,005	3,70

Parmi les huit extraits protéiques en albumine de citrouille, l'échantillon 82 représente l'extrait le plus actif avec une valeur d' EC_{50} de l'ordre $0,2829 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et un TAC de $3,5344 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L}$. Par contre, l'activité antioxydante la plus faible a été affichée par l'extrait 93 ($EC_{50} = 1,9450 \text{ g/L}$, TAC = $0,5141 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L}$), qui est 7 fois moins actif que l'extrait 82. Une activité intermédiaire a été obtenue pour les autres extraits avec des valeurs d' EC_{50} de 1,04 à 6 fois moins actifs que l'extrait 82. Dans l'extrait de la Globuline, l'échantillon 81 représente l'extrait le plus actif avec une EC_{50} de l'ordre $0,8539 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et un TAC de $1,1710 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L}$. Par contre, l'activité antioxydante la plus faible a été affichée par l'extrait 84 ($EC_{50} = 10,3604 \text{ g/L}$, TAC = $0,0965 \text{ L/g}$). L'extrait de l'échantillon 81 est 12 fois plus actif que l'extrait 84.

Comparativement avec les antioxydants standards, tous les extraits de la globuline testés s'avèrent moins actifs sauf l'extrait 81 qui est 4 fois plus actif que le BHT. La vitamine C, la vitamine E, le Trolox et le BHA qui exhibent presque le même statut antioxydant, sont plus actifs que, l'extrait 81. Tandis que, l'extrait 82 représente le même pouvoir réducteur que ce BHT (environ $3,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

L'extrait protéique en albumine pour l'échantillon 82 possède une activité réductrice remarquable. Il représente le même pouvoir réducteur avec le BHA (environ $0,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). De même, il est 13 fois plus actif que le BHT et qui est aussi le moins actif que les autres extraits étudiés. Ainsi l'extrait 93 en albumine qui est le moins actif, s'avère moins actifs que les antioxydants standards à la moyenne de 20 fois seulement à l'exception de la vitamine C, qui est autour de 28 fois plus actif que l'extrait 93. Les extraits protéiques de l'albumine, ont montré des activités réductrices intéressantes avec des valeurs d' EC_{50} qui s'échelonnent de $0,283$ et $1,945 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Nous avons essayé de trouver une corrélation entre les valeurs d' EC_{50} de DPPH et EC_{50} de phosphomolybdate, mais on a obtenu une faible corrélation ($R^2 < 0,4$). La seule explication de cette indépendance est que l'activité dans le test de DPPH est différente par rapport à l'activité dans le test de phosphomolybdate.

En conclusion, les valeurs d' EC_{50} trouvées par le test du DPPH sont plus importantes que celles trouvées par le test phosphomolybdate. Comparativement aux antioxydants de référence (Figure 10, annexe 1), les extraits protéiques des graines de citrouille s'avèrent plus actifs en activité réductrice qu'en activité antiradicalaire. Ce résultat peut être expliqué que les extraits étudiés renferment des composés protéiques de structures chimiques différentes et que l'activité antioxydant étudiée par ce test ne dépend pas obligatoirement de la concentration des composés protéiques.

III.4.2.3. Test du phosphomolybdate des polyphénols

Les EC_{50} sont calculés à partir des courbes figurant la variation du pourcentage de réduction des antioxydants en fonction de leurs concentrations exprimées en g/l (Figure III.23 et III.24).

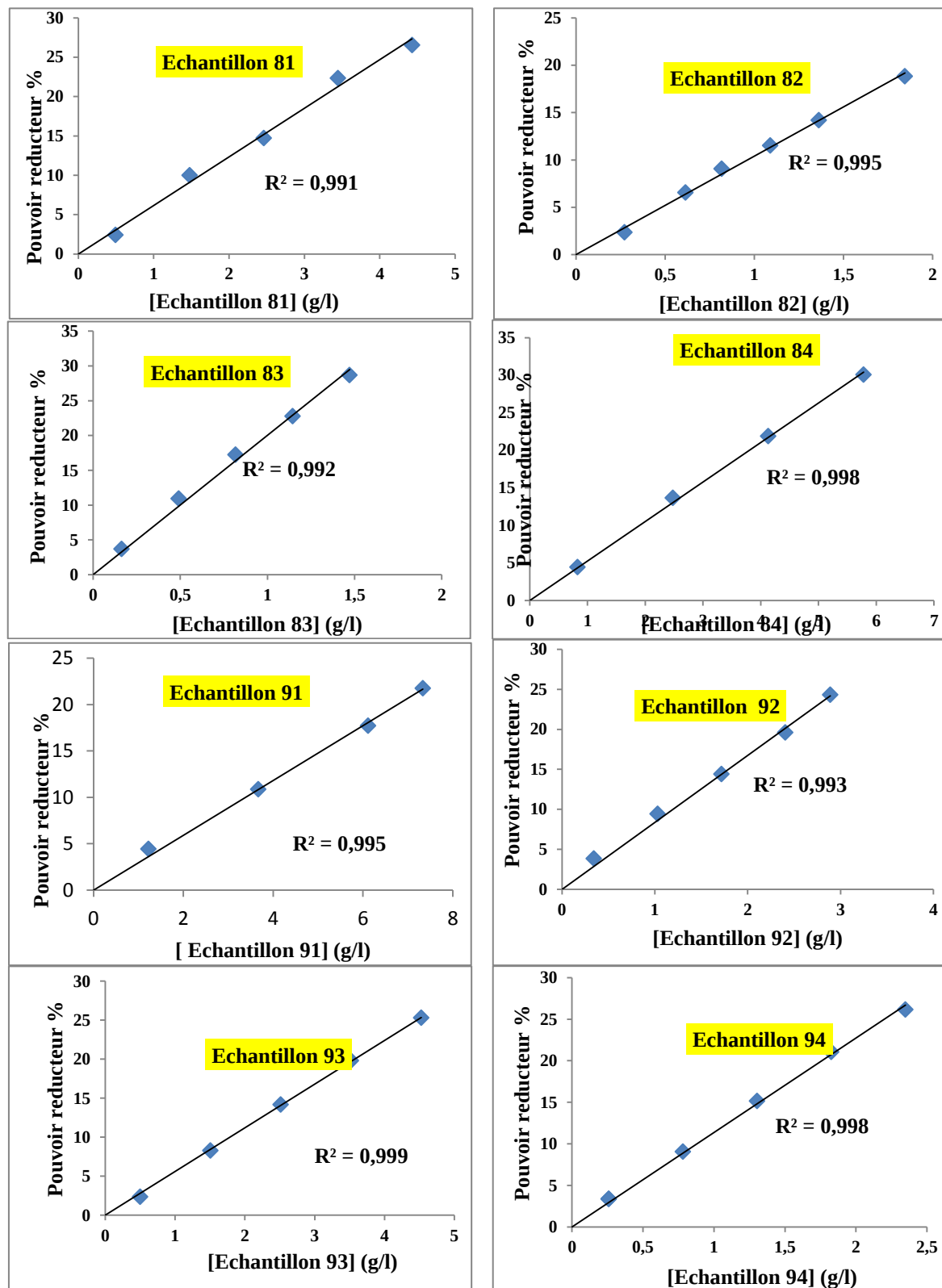


Figure III.23. Courbes représentant la variation des pourcentages réducteurs en fonction des concentrations des extraits phénoliques (**Système : MeOH/Eau**) dans le test du PPM

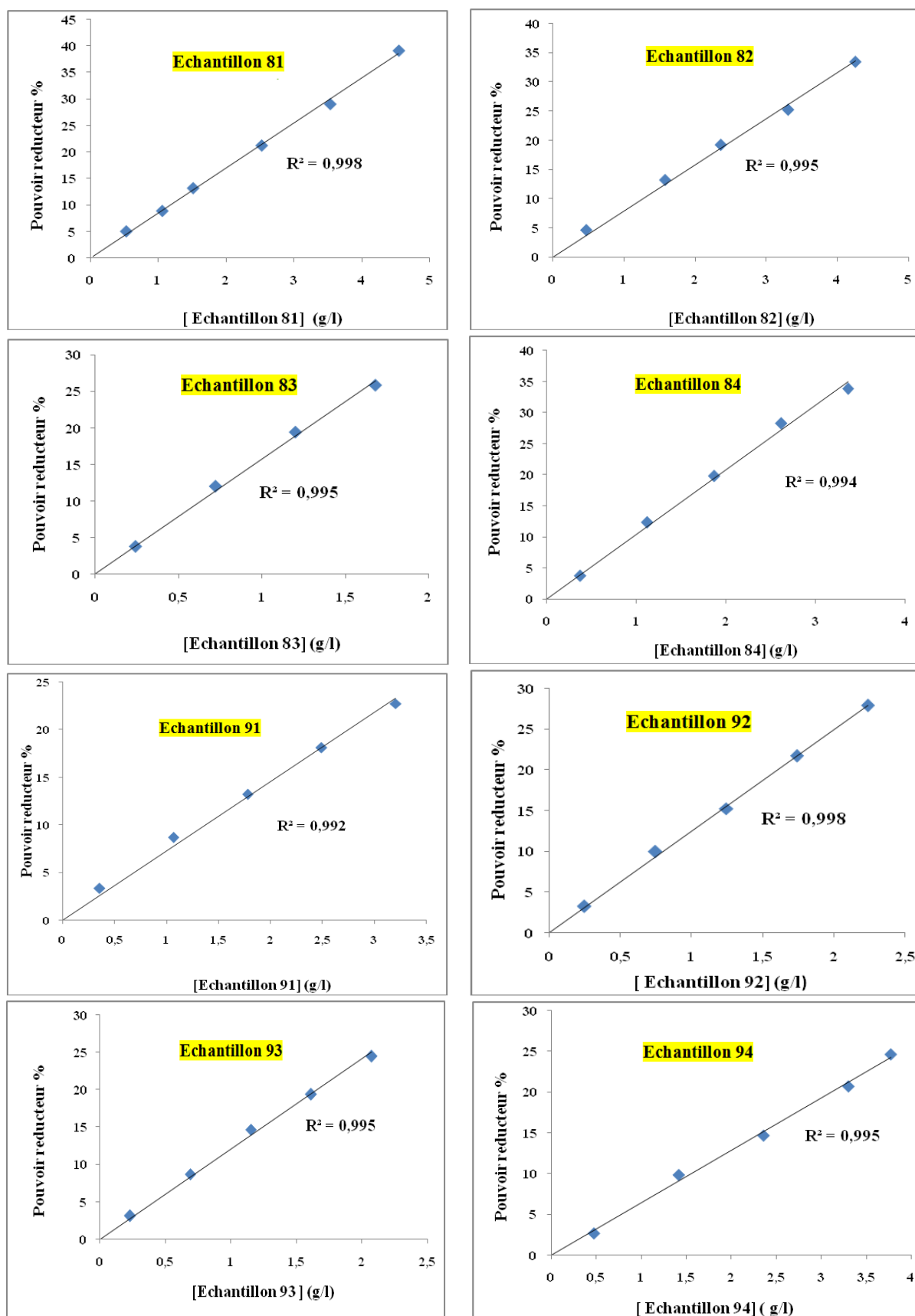


Figure III.24. Courbes représentant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations des extraits phénoliques (système : **Acétone/Eau**) dans le test du PPM

Les valeurs obtenues de l'EC₅₀ (concentration effective à 50%) sont mentionnées dans le tableau III.17. Les valeurs de l'activité antioxydante obtenus à travers la macération **hydro-méthanolique**, révèlent que les extraits des graines de citrouille possèdent des activités réductrices. L'ensemble des extraits étudiés révèle des propriétés antioxydantes moyennement intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de EC₅₀. Ainsi, nous remarquons que les valeurs obtenues varient entre 2,49 et 16,93 mg/ ml pour les graines des échantillons 83 et 91 respectivement.

Parmi les huit extraits phénoliques de citrouille, l'échantillon 83 représente l'extrait le plus actif avec une EC₅₀ de l'ordre 2,49 mg /ml et un TAC de 0,4. Par contre, l'activité antioxydante la plus faible a été affichée par l'extrait 91 (EC₅₀ = 16,93 mg/ml, TAC = 0,06), qui est 7 fois moins actif que l'extrait 83. Une activité intermédiaire a été obtenue pour les autres extraits avec des valeurs d'EC₅₀ de 1.04 à 6 fois moins actifs que l'extrait 83.

Tableau III.17. Les valeurs d'EC₅₀ et du TAC des différents extraits phénoliques dans le test du PPM

Echantillon	Système d'extraction	EC ₅₀ (g/l)	TAC (l/g)
81	MeOH/Eau	8,10 ± 0,10	0,12
	Acétone/ Eau	5,89 ± 0,20	0,17
82	MeOH/ Eau	4,81 ± 0,15	0,20
	Acétone/ Eau	8,48 ± 0,30	0,11
83	MeOH/ Eau	2,49 ± 0,10	0,40
	Acétone/ Eau	3,17 ± 0,20	0,31
84	MeOH/ Eau	9,51 ± 0,51	0,10
	Acétone/ eau	4,80 ± 0,33	0,20
91	MeOH/ Eau	16,93 ± 0,56	0,06
	Acétone/ Eau	6,88 ± 0,43	0,14
92	MeOH/ Eau	5,97 ± 0,31	0,17
	Acétone/ Eau	4,00 ± 0,25	0,25
93	MeOH/ Eau	8,93 ± 0,41	0,11
	Acétone/ Eau	4,15 ± 0,25	0,24
94	MeOH/ Eau	4,40 ± 0,26	0,23
	Acétone/ Eau	7,77 ± 0,36	0,13
Vitamine C	/	0,07 ± 0,001	14,28
Vitamine E	/	0,08 ± 0,001	10,00
Trolox	/	0,07 ± 0,001	12,50
BHT	/	3,60 ± 0,002	0,28
BHA	/	0,27 ± 0,005	3,70

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs sauf l'extrait 83 qui est 1,5 plus actif que le BHT. La vitamine C, la vitamine E et le Trolox qui exhibent presque le même statut antioxydant, sont 30 fois plus actifs que l'extrait 83. Tandis que, le BHA est 2 fois plus actif que l'extrait 83. En effet, le bon effet de l'extrait 83 est probablement attribué à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Pour l'échantillon 91 qui renferme une teneur faible en polyphénols et en flavonoïdes parmi les huit extraits, il possède l'activité antioxydante la plus basse. Ceci peut être expliqué par le fait que l'activité antioxydante est due principalement à la contribution des composés phénoliques. Ces résultats sont confirmés par d'autres études déjà réalisées sur les polyphénols naturels (Attarde *et al.*, 2010). Pour des raisons de comparaison, l'histogramme suivant représente la variation des valeurs d'EC₅₀ en fonction des extraits et standards investigués (Figure III.25).

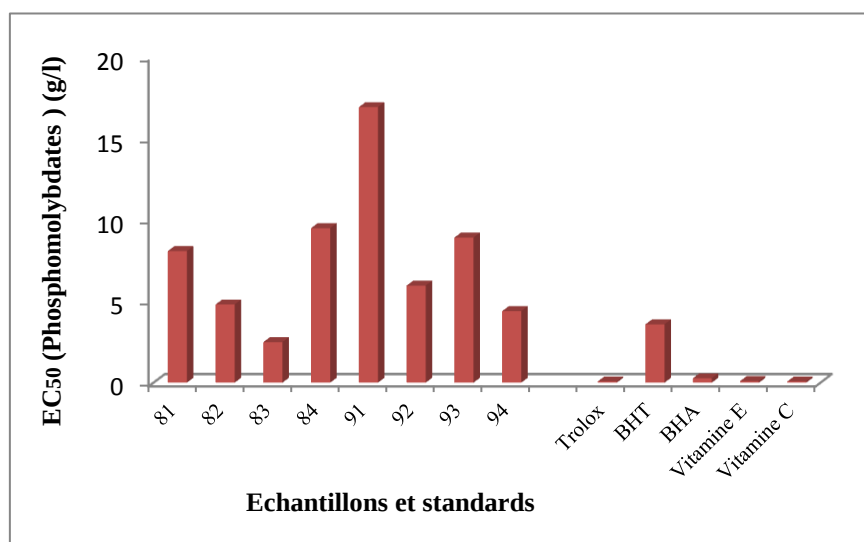


Figure III.25. Comparaison des valeurs d'EC₅₀ des extraits phénoliques (Système : MeOH /Eau) et standards dans le test du PPM

D'autre côté, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative entre le pouvoir réducteur des quatre extraits de citrouille de l'année 2008 et leurs taux d'extraction ($R^2 = 0,88$) (Figure 12 ; Annexe 1). De plus, une bonne corrélation linéaire a été repérée entre les pouvoirs antioxydants mesurés par les deux tests du DPPH et phosphomolybdate ($R^2 = 0,85$) (Figure III.26). Ce résultat suggère que les extraits qui ont fourni un pouvoir antiradicalaire important exposent un statut réducteur faible. C'est-à-dire, les extraits ayant la capacité de piéger le radical DPPH', pourra être attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R') par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle.

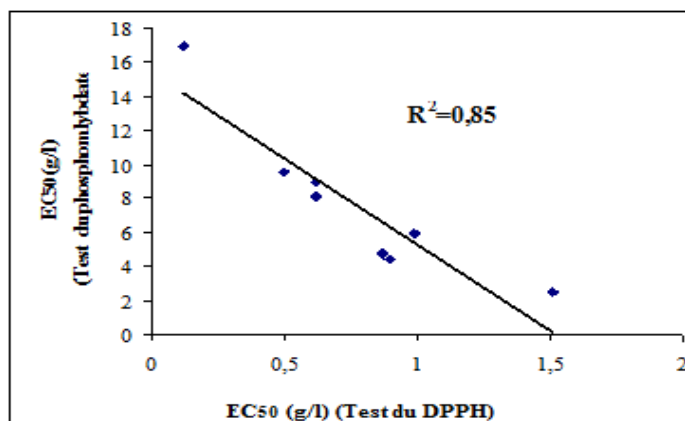


Figure III.26. Corrélation entre le test du DPPH et le test du PPM (Système : MeOH/Eau)

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons réducteurs des ions métalliques (Boxin et al., 2002). Cependant, dans la présente étude des corrélations faibles et non significatives ($R^2 < 0,04$) ont été mise en évidence entre le pouvoir réducteur des extraits des graines de citrouille et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents. Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux réducteurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange de composés tel que les acides organiques, les acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la chélation des métaux de transition (Ecoumou., 2003). De plus, la capacité réductrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Ecoumou., 2003). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas réduire les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas les groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité réductrice.

En conclusion, les valeurs d' EC_{50} trouvées par le test du DPPH sont plus importantes que celles trouvées par le test du phosphomolybdate. Mais comparativement aux antioxydants de référence, les extraits phénoliques des graines de citrouille s'avèrent plus actifs en activité réductrice qu'en activité antiradicalaire. En effet, aucune corrélation n'a été établit entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes des extraits de graine de citrouille. Ce résultat peut être expliqué que les extraits étudiés renferment des composés phénoliques de structures chimiques différentes et que l'activité antioxydante étudiée par ce test ne dépend pas obligatoirement de la concentration des composés phénoliques.

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes

qui contiennent des composés bioactifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité, on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle. De cet fait, l'objet de notre travail a porté sur de l'activité antioxydante de quelque graines de *Cucurbita pepo* (citrouille locale) qui sont utilisées en médecine traditionnelle locale comme des vermifuges.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits phénoliques obtenus montrent que nos graines contiennent toutes des composés phénoliques avec des teneurs qui varient entre 38.86 et 19.8 mg GAE/100 g de tourteaux. Cependant, les échantillons récoltés dans l'année 2008 renferment les quantités en phénols totaux les plus importantes par rapport aux échantillons de l'année 2009. Les valeurs des quantités de flavonoïdes obtenus par la méthode du chlorure d'aluminium sont comprises entre 55.51 et 105.9 mg CE/100g de tourteaux. Toutefois, une bonne corrélation positive entre la teneur en phénols totaux et le taux des flavonoïdes a été détectée ($R^2 = 0,93$). Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité des flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en polyphénols d'un échantillon à un autre et que les graines étudiées renferment en général un matériel polyphénolique riche en composés flavonoïdiques

L'évaluation des propriétés antioxydantes par deux tests chimiques *in vitro* à savoir le test au DPPH et le test au phosphomolybdate révèle que toutes ces plantes manifestent une intéressante activité et plus particulièrement dans le balayage du radical DPPH $\cdot$. Dans le test du DPPH, les extraits phénoliques des différents échantillons ont affiché un pouvoir antiradicalaire allant de 0,66 au 8,19 g $^{-1}$.L. La valeur la plus élevée est observée pour l'extrait 91. Tandis que, l'échantillon 83 a donné un statut antiradicalaire relativement faible. Mais comparativement aux antioxydants de référence, ces antioxydants ont un statut antiradicalaire assez faible. Cependant, nous avons constaté que nos extraits se présentent comme des agents antioxydants relativement puissants par rapport à d'autres extraits de plantes déjà étudiés. De plus, aucune corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques des extraits n'a été établie.

L'effet réducteur de nos extraits a été mis en évidence par une évaluation de leurs propriétés donatrice d'électrons pour passer l'ion molybdène de l'étage d'oxydation 6 (Mo $^{6+}$) à un degré d'oxydation 5 (Mo $^{5+}$). D'après ce test, il apparaît que ces extraits, présentent des propriétés antioxydantes intéressantes et plus particulièrement l'extrait 83. Ainsi, les valeurs obtenues varient entre 2,49 et 16,93 mg/ml pour les graines des échantillons 83 et 91 respectivement.

Les résultats obtenus à travers la macération **hydro-acétonique**, montrent que les différents extraits de graines de citrouille ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Mo^{5+} -Phosphate), suggérant qu'ils possèdent une activité antioxydante tout en réduisant l'ion Mo^{6+} en ion Mo^{5+} . Le pouvoir réducteur des antioxydants de référence a été aussi suivi et les résultats obtenus sont clairement enregistrés (Figure 10, Annexe 1).

À partir des profiles de réduction obtenus pour nos extraits phénoliques, il semble que la variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits donne des tracés de linéarité très importante. Cependant, les valeurs du pourcentage de réduction n'excèdent pas 50%. Cela reflète simplement la nature des extraits contenant un ou plusieurs agents réducteurs ayant des affinités différentes pour l'ion Mo^{6+} .

Les valeurs d' EC_{50} obtenues avec les extraits étudiés (3,17 à 8,48 mg/ml), reflètent ainsi leur puissants effets réducteurs. Mais comparativement aux antioxydants de référence, seul l'extrait de l'échantillon 83 montre son efficacité la plus importante par rapport aux autres échantillons. Ainsi, cet extrait présente un grand paradoxe, d'une part il possède la valeur d' EC_{50} la plus faible en comparaison avec les autres extraits (Tableau III.17) donc c'est l'extrait le plus actif. De l'autre part et comparativement au test du DPPH c'est l'extrait qui a montré une propriété antiradicalaire la plus importante. Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où les composés phénoliques qui agissent généralement comme balayeur des radicaux libres, peuvent exposer un pouvoir réducteur des ions métalliques relativement faible (Shahin Sharif Ali et al., 2008 ; Boxin et al., 2002 ; Ecoumou., 2003).

De plus, mise à part son effet antiradicalaire le plus important, l'extrait 94 représente un effet réducteur presque le plus bas. Son effet semble être lié à sa pauvreté en polyphénols et en flavonoïdes. Cependant, ce n'est pas le cas pour l'extrait 82, qui est riche en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes mais avec un pouvoir réducteur très faible. Alors, les extraits donnant ainsi un potentiel antioxydant remarquable, est donc partiellement attribuée à la présence d'autres substances plus actives que celles présentes dans les autres extraits.

À l'exception des extraits 81 et 94, tous les extraits testés dans cette étude présentent une corrélation linéaire significative entre leurs effets réducteurs du molybdène hexavalent et leurs teneurs en flavonoïdes ($R^2 = 0,74$) (Figure III.27). Cependant, une faible corrélation et non significative ($R^2 = 0,15$) a été mise en évidence entre le pouvoir réducteur des extraits des graines de citrouille et leurs teneurs en composés phénoliques.

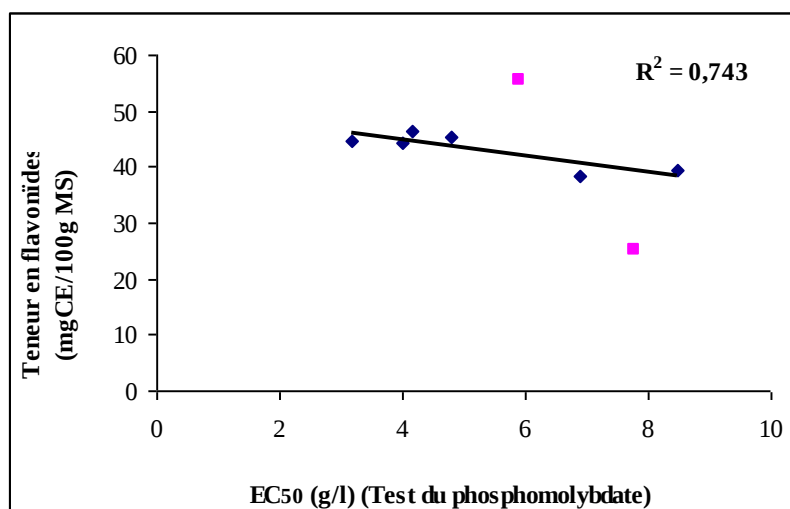


Figure III.27. Variation des teneurs en flavonoïdes (**Système : Acétone/Eau**) en fonction des valeurs d' EC_{50} dans le test du PPM

A des fins comparatives, nous avons schématisé dans l'histogramme ci-après (Figure III.28) les valeurs d' EC_{50} obtenus à travers les deux tests pour les huit échantillons de citrouille.

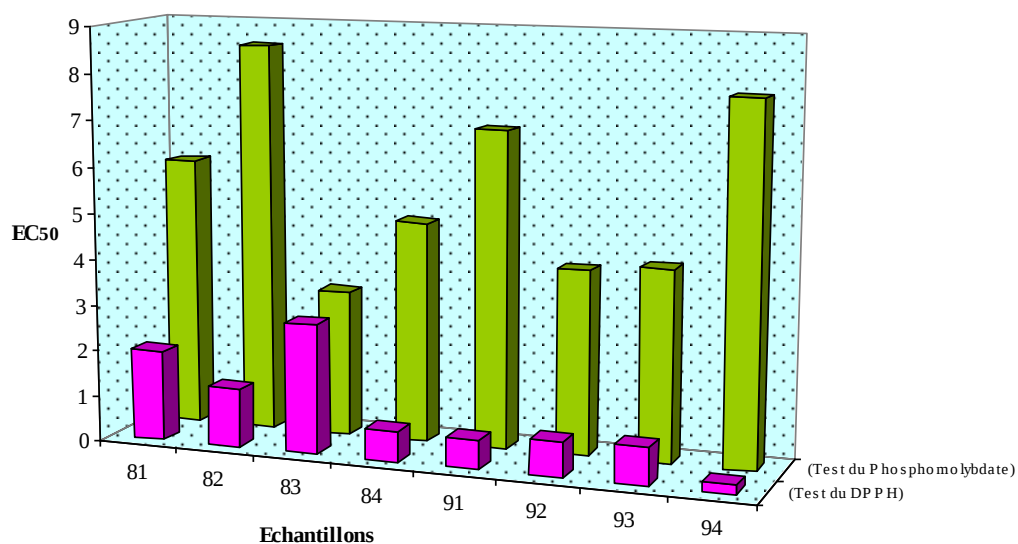


Figure III.28. Variation des teneurs en flavonoïdes (**Système : Acétone/Eau**) en fonction des valeurs d' EC_{50} dans le test du PPM

D'après l'histogramme précédent, il est clair que le pouvoir antioxydant déterminé par le test du DPPH pour tous les extraits est plus important que celui obtenu à partir du test au phosphomolybdate, ce qui prouve que ces extraits sont de bons agents antiradicalaires. De plus, cette augmentation de la capacité antioxydante, est probablement attribuée à une élévation du taux d'antioxydants donneurs de protons dans les extraits étudiés.

Il faut signaler également, que la capacité antioxydante totale des échantillons de l'année 2009, ont effet antioxydant le plus significatif. Cependant, pour le test au phosphomolybdate, on constate qu'il y a une fluctuation des valeurs du pouvoir antioxydant entre les échantillons des deux années. Néanmoins, ces variations des activités antioxydantes semblent d'être dues à la période et aux conditions climatiques de récolte.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces graines et révèle leur intérêt dans le cadre de l'exploitation des déchets agroalimentaires. Globalement, les résultats obtenus sont encourageants et mériteraient d'être confirmés par d'autres tests *in vitro* et *in vivo*. Mais, pour faire la distinction entre les extraits doués d'un effet piègeur du radical DPPH proprement dit de ceux ayant un effet réducteur de l'ion Mo^{6+} , nous devons faire d'autres techniques complémentaires, et ce n'est qu'après l'analyse des valeurs d' EC_{50} qui seront obtenues par ces techniques complémentaires, qu'on peut affirmer l'effet piègeur des radicaux libres ou réducteur des ions métalliques de ces extraits phénoliques. En outre, ces résultats montrent que nos extraits fournissent des activités antioxydantes assez importantes qui peuvent être liées à la présence de certaines molécules bioactives. Également il sera envisageable, de tester ces extraits biologiquement pour tenter de chercher par exemple des anti-inflammatoires, des antifongiques, des antibactériens, des inhibiteurs d'enzyme, ou autres. Aussi, serait-il souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de graines et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques.

Alors, la future recherche sera consacrée pour déterminer la teneur de différents phénols et de leur partie relative dans le potentiel antioxydant. Ainsi, le pouvoir antioxydant des extraits pourra être encore soutenue par la teneur en composés phénoliques et de leurs types de molécules individuellement actives.

Conclusion Générale

La plante citrouille est parmi les plantes largement exploitées dans la civilisation islamique et fortement utilisées de nos jours en médecine traditionnelle à travers le monde. De cet effet, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à la détermination de la composition chimique des huiles extraites en acides gras, triglycérides et tocophérols ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles, des extraits protéiques et des extraits phénoliques de huit échantillons de graines de citrouille locales (cultivées en Algérie). À ce jour, on ne sait rien sur les caractéristiques de l'huile d'aucun de nos huit échantillons sélectionnés dans cette étude. En outre, il existe peu d'études sur l'huile de graines de citrouille à partir de plusieurs milliers de cultivars de *Cucurbita pepo*.

Les résultats de la présente étude ont montré que les graines de citrouille algérienne contiennent des quantités appréciables de tocophérols totaux et matières grasses brutes. La teneur en huile des graines varie de 15,8 à 33,5% (m/m). Ces valeurs sont en accord avec d'autres espèces de *cucurbita*, et différentes avec d'autres variétés de *cucurbita pepo*.

L'analyse par CPG de l'huile extraite des graines de citrouille (récoltées à Sebgag, wilaya de Laghouat ; Algérie), a montré que les AGs dominants trouvées dans les huiles étudiées sont: le palmitique C16: 0 (13,9 à 20,0%), l'acide stéarique C18 :0 (9,6à 17,7%), l'acide oléique C18:1 (26,2 à 39,6%) et l'acide linoléique C18:2 (28,7 à 44,0 %). Les teneurs importantes en acides gras insaturés suggèrent leur utilisation potentielle nutritionnelle pour des prestations de santé.

Grâce à l'utilisation conjointe de la digestion enzymatique par la lipase pancréatique de porc et la méthode empirique de Gunstone et celle de coleman, nous avons pu réaliser une étude complète des triacylglycérols (TAG) des huiles des cucurbitacées, étude non encore entreprise à notre connaissance pour les graines de citrouille poussant en Algérie.

Dans un premier temps, la composition des TAG des huiles en acides gras montre que les acides gras insaturés oléique et linoléique représentent respectivement entre (16.80-38.60%) et (37.80-55.90%) des acides gras totaux, marge que l'on retrouve dans toutes les huiles alimentaires d'origine végétale.

Les résultats de la digestion enzymatique par la lipase de porc montrent que la distribution des AGs dans les TAGs obéit aux règles de positions énoncées par plusieurs auteurs : la position Sn-2 est préférentiellement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique), résultats déjà publiés pour plusieurs huiles d'origines végétales. De même les isomères des TAGs majoritaires sont ceux possédant l'acide linoléique en position Sn-2. Selon la théorie de distribution de

Gunstone, sept TAGs ont été identifiés: LOL, LLL, OOL, LPL, OPL, LStL et OStL. Le contenu de ces TAGs varie d'une façon d'un échantillon à un autre plus ou moins importante. Ainsi, dans l'échantillon 84, la composition quantitative de ces sept TAGs représente plus de 83% du total des TAGs, avec une domination de LOL (23%); tandis que, la composition quantitative la plus basse de ces TAGs majeures a été trouvée dans l'échantillon 83 qui représente 52,5 % des TAGs totaux. Dans les autres échantillons, les compositions quantitatives des sept TAGs principales montrent un contenu similaire et proche (environ de 70%) des TAGs totaux, avec une domination de LOL (10-23 %).

Les proportions de différentes classes de triacylglycérols trisaturés (GS₃), disaturés (GS₂U), monosaturés (GSU₂) et triinsaturés (GU₃) varient respectivement entre (0,00-0,04), (7,80-26,10), (40,20-50,00) et (23,9-52,00). Ces valeurs sont en bon accord avec les courbes de Gunstone.

L'analyse des tocophérols en huiles dans les échantillons étudiés de cucurbitacée par CLHP fait apparaître une forte prédominance des isomères (β + γ)-tocophérol, surtout pour les échantillons 81 et 83 avec des teneurs de 155,1 mg/kg et 126,7 mg/kg respectivement à l'exception de l'échantillon 94 dans toutes les huiles de graines de citrouille étudiés (plus de 40% de total tocophérols). L'isomère δ -tocophérol est le deuxième composant majeur (39,1-103,0 mg / kg de teneur en huile) dans tous les échantillons d'huile.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits protéiques obtenus par la méthode de Biuret montrent que nos graines contiennent des composés protéiques totaux avec des teneurs qui varient entre 20,427 et 57,225 g/100g de tourteaux. Par contre les résultats obtenus par la méthode du Lowry sont moins significatifs par rapport à ceux obtenus par la méthode de Biuret. Ils sont compris entre 2,980 et 7,159 g/100g de tourteaux.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits phénoliques obtenus par le système d'extraction **(MeOH/Eau)**, montrent que nos graines contiennent toutes des composés phénoliques avec des teneurs qui varient entre 38,86 et 19,8 mg GAE/100 g de tourteaux. Les valeurs des quantités de flavonoïdes obtenus par la méthode du chlorure d'aluminium sont comprises entre 55,51 et 105,9 mg CE/100g de tourteaux. Toutefois, une bonne corrélation positive entre la teneur en phénols totaux et le taux des flavonoïdes a été détectée ($R^2 = 0,93$). Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité des flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en polyphénols d'un échantillon à un autre et que les graines étudiées renferment en général un matériel polyphénolique riche en composés flavonoïdiques. Le dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu obtenus par le système d'extraction **(Acétone/Eau)** montrent que les

extraits dévoilent des teneurs en phénols totaux s'étalent de 26,68 à 46,38 mg équivalents en acide gallique par 100 g de tourteaux. Cependant, la détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que tous les extraits sont une source prometteuse en flavonoïdes avec des teneurs allant de 25,13 à 55,57 mg équivalents en rutine par 100 grammes de tourteaux. Cependant, l'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire peu significative ($R^2 = 0,33$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci pourra être expliqué par le fait que les flavonoïdes ne représentent pas les composés majoritaires des polyphénols totaux.

La détermination de l'activité antioxydante des extraits par la mesure de leur pouvoir piègeur du radical DPPH par donation de protons et leur aptitude à réduire l'ion molybdène hexavalent par transfert d'électrons, permet de constater que les extraits des graines de citrouille semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été établies *in vitro*.

Par conséquent, toutes les huiles extraites ont montrées une activité similaire de piégeage des radicaux DPPH. Les extraits lipidiques possèdent une activité antiradicalaire assez faible, la valeur d' EC_{50} varie de 17,9 à 41,7 g.L⁻¹. La meilleure activité antioxydante a été remarquée par l'huile extraite à partir de l'échantillon 94. Cette huile contient la plus grande quantité de contenu δ -tocophérol. Ainsi, le bon pouvoir antiradicalaire de l'extrait de cette huile peut être dû à la présence de haut teneur en δ -tocophérol ou à la présence des autres métabolites secondaires.

Dans le test du DPPH, les extraits protéiques en albumine des différents échantillons ont affiché un pouvoir antiradicalaire allant de 0,112 au 0,834.g.L⁻¹. Ces extraits ont un statut antiradicalaire remarquable par rapport aux BHT, BHA et le Trolox, qui sont 19 fois plus actifs que l'extrait 82. Les extraits protéiques en Globuline des différents échantillons ont affiché un pouvoir antiradicalaire allant de 0,309 au 3,802 g. L⁻¹. La valeur la plus élevée a été observée pour l'extrait 81. Mais comparativement aux antioxydants de référence, ces extraits ont un statut antiradicalaire assez faible puisque le BHT et BHA et Trolox, sont 55 fois plus actifs que l'extrait 81.

Les extraits phénoliques renferment des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses. Tous les valeurs d' EC_{50} sont relativement basses comparativement aux antioxydants de référence, elles sont comprises entre 0,12 et 2,817 g.L⁻¹. Cependant, nous avons constaté que nos extraits se présentent comme des agents antioxydants relativement puissants par rapport à d'autres extraits de plantes déjà étudiés.

Le test du phosphomolybdate confirme que la capacité antioxydante totale observée dans toutes les huiles extraites a des valeurs d'EC₅₀ qui varient de $18,8 \pm 0,3$ à $56,3 \pm 0,2$ g.L⁻¹. Toutes les huiles extraites ont une activité plus faible comparativement aux antioxydants standards. La capacité antioxydante la plus élevée a été révélée pour l'échantillon 84. Son effet était presque cinq fois moins que le BHT. Les valeurs de l'activité antioxydante obtenues à partir des extraits protéiques révèlent que nos graines possèdent des activités réductrices de doses dépendantes. L'ensemble des extraits étudiés révèle des propriétés antioxydantes moyennement intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de EC₅₀. Ainsi, nous remarquons que les valeurs obtenues pour l'albumine varient entre 0,2829 et 1,9450 g.L⁻¹ pour les extraits des échantillons 82 et 93 respectivement. Le test de l'activité réductrice a révélé que les valeurs d'EC₅₀ obtenues avec les extraits phénoliques étudiés ($2,49$ à $16,93$ g. L⁻¹), reflètent ainsi leurs puissants effets réducteurs. Mais comparativement aux antioxydants de référence, seul l'extrait de l'échantillon 83 manifeste un pouvoir réducteur relativement supérieur à celui du BHT.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant d'approfondir l'étude par l'analyse qualitative et quantitative des stérols individuels, les coposés phénoliques et la composition en acides aminés des protéines. Cependant, l'étude *in vivo* des extraits des graines de citrouille vont permettre d'évaluer l'effet biologique de ces extraits.

Références bibliographiques

- Alais Charles., Linden Guy ., Miclo Laurent . (2008).** Biochimie alimentaire. 6^{ème} édition. *Dunod*. Paris.
- Alfawaz MA. (2004).** Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita Maxima*) Seed Kernels. *Food Sci Agric Res.* (Center, King Saud Univ., Res. Bult). Vol 129: 5-18.
- Al-Khalifa AS. (1996).** Physicochemical characteristics, fatty acid composition and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oil. *J Agri Food Chem.* 44(4): 964-966.
- Anwar F., Anwer T., Zahid M. (2005).** Methodical characterization of rice (*Oryza sativa*) bran oil from Pakistan. *Grasas y Aceites.* Vol 56(2):125-134.
- Attarde DL., Kadu SS., Chaudhari BJ., Kale SS., Bhamber RS. (2010).** *In vitro* Antioxidant activity of Pericarp of *Cucurbita maxima* Duch. ex Lam. *Int J Pharm Tech Res.* Vol 2(2): 1533-1538.
- Bachmann Janet. Mis à jour par Adam. L. Katherine. (2003).** Spécialistes agricoles du National Center for Appropriate Technology (NCAT) © NCAT. **Mise à jour de (2010)** Publication ATTRA N° IP371.
- Bachmann Janet., Adam Katherine. (2010).** Organic Pumpkin and Winter Squash Marketing and Production. *Publish organization: ATTRA.*
- Bagepalli Srinivas Ashok Kumar., Vontoor Byrappa Narayana Swamy., Peresandra Avalakondarayappa Arun Kumar and SaleemullaKhan. (2010).** Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chitrakadi Vati, a Ayurvedic Formulation. *Internet J of Food Saf.* Vol 12:158-164.
- Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentiel. *Edition Mauritius.* p 133.
- Barlow SM. (1990).** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: Hudson, B.J.F. (Ed.), *Food Antioxidants.* (pp. 253-307). Barking, England: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Barreto M Carmo. (2005).** Lipid extraction and cholesterol quantification. *J. Chem. Educ .* Vol 82(1): 103-104.
- Barros MP., Lemos M., Maistro EL., Leite MF., Sousa JP Bastos., Andrade SF JK. (2008).** Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol120(3):372-377.

Bartosz Grzegorz. (2003). Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Comments on Toxicology*. Vol 9(1): 5-21.

Bazzano Lydia A., Serdula Mary K., Simin Liu. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*. Vol 5(6): 492-499.

Bérard Laurence ., Barrau Jacques ., Marchenay Philippe . (2000). Polenta, cassoulet et piperade, l'introduction des plantes du Nouveau Monde dans les cuisines régionales. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*. Vol 42 (42) : 65-80.

Bereau Didier. (2001). Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences des agroressources. Toulouse, INPT. France.

Berges RR., Windeler J., Trampisch HJ., Senge T. (1995). Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group. *Lancet*. Vol 345, N° 8964 :1529-32.

Berges RR., Vukanovic J., Epstein JI, CarMichel M., Cisek L., Johnson DE., Veltri RW., Walsh PC. and Isaacs JT. (1995). Implication of Cell Kinetic Changes during the Progression of Human Prostatic Cancer. *Clin Cancer Res*. Vol 1(5): 473–480.

Bilyk A., Piazza GJ., Bistline RG. and Haas MJ. (1991). Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by TLC. *Lipids*. Vol 26: 405-406.

Blanchard Olivier . (1981). Output, the Stock Market, and Interest Rates. *American Economic Review*. Vol 71(1) : 132-43.

Blond JP. (1993). Corps Gras. *Rev .Fr*. Vol 40(3-4):113-20.

Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C. (1997). Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*. Vol 30 (6): 609– 615.

Bonoli M., Verardo V., Marconi E. and Caboni MF. (2004) . Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Agric. J., Food Chem*. Vol 52(16): 5195-5200.

Bourgeois Claude. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. *Editions TEC & DOC*. Pages 11, 74, 86 - 90, 274 - 277, 636 - 656.

- Boussoussa H., Hamia C., Djeridane A., Boudjeniba M. and Yousfi M. (2014).** Effect of different Solvent Polarity on Extraction of Phenolic Compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* Flowers and their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Current Chemical Biology*. Vol 8(1): 43-50.
- Boutabet K., Kessa W., Alyane M. and Lahoual M. (2007).** Polyphenolic fraction Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J Nephrol*. Vol 21(2): 101-106.
- Boxin Ou., Dejian Huang., Maureen Hampsch-woodill., Judith A Flanagan. and Elizabeth K Deemer. (2002).** Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol 50(11): 3122-3128.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME. and Berset C. (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*. Vol 28 (1):25-30.
- Bratti Jaques. (1972).** Cours d'enzymologie. Chapitre 14, p 387.
- Brigelius-Flohe Regina et Traber Maret G. (1999).** Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*. vol 13(10) : 1145-1155.
- Brockerhoff H. (1971).** Stereospecific analysis of triglycerides. *Lipids*. Vol 6(12) : 942 – 956.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. P: 278 - 279.
- Caili F., Huan S., Quanhong L. (2006).** A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods Hum Nutr*. 61(2) PP: 73-80.
- Calet C et Dronne Yves. (1996).** L'approvisionnement protéique des hommes et des animaux aspects nutritionnelles économiques et réglementation en protéine végétal. 2^{ème} édition, *Lavoisier et TEC .DOC*. page 2. France.
- Calgarotto AK., Miotto S., Honório KM., Da Silva ABF., Marangoni S., Silva JL., Comar JrM., Oliveira KMT. and Da Silva SL. (2007).** A multivariate study on flavonoid compounds scavenging the peroxynitrite free radical. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. Vol 808(1-3): 25-33.
- Carpentier Yvon A. (1996).** Actions immunomodulatrices des lipides. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. Vol 10(2): 97-105.

Carriere F., Barrowman JA., Verger R., Laugier R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*. Vol 105(3): 876-888.

Castilho Garcia Carolina., Aparecida Mauro Maria., Kimura Mieko. (2007). Kinetics of osmotic dehydration and air-drying of pumpkins (*Cucurbita moschata*). *Journal of Food Engineering*. 82(3): 284–291.

Catalano L., Franco I., De Nobili M., and Eita L. (1999). Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*. Vol 43(5-6): 193-205.

Chang Chew Sew., Nurul Aqilah M Z., Farooq A., Azizah AH., Nazamid S. (2010). Nutritional composition and oil fatty acids of Kundur [*benincasa hispida* (thunb.) Cogn.] Seed. *Pak J Bot*. Vol 42(5): 3247-3255.

Charef M. (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en chimie. Université kasdi merbah- Ouargla. Algerie.

Charef M., Yousfi M., Saidi M. and Stocker P. (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc*. Vol 85:921–924.

Charles A., Guy L., Laurent M. (2003). Lipides. In biochimie alimentaire. Ed : Dunod, paris, p51-71.

Charpentier Brigitte., Hamon-Lorléac'h Florence., Harlay Alain ., Huard Alain., Ridoux Lionel. (2008). Guide du préparateur en pharmacie (3ème édition). Editeur : ELSEVIER / MASSON. Paris, p 1374.

Charrouf M. (1984). Contribution à l'étude chimique de l'huile d'*Argania spinosa*. (L)Sapotaceae. Thèse université de Perpignan. France.

Chazan JB et Szulc M. (1987). Free radicals and vitamin E. *Cah. Nutr. Diet*. Vol 22: 66-70.

Chevalley I. (2000). Contribution à l'étude phytochimique des *Saxifracées* : isolement d'antioxydants à partir de *Saxifraga stellaris* L. et *Saxifraga cuneifolia* L. et d'un composé antifongique de *Ribes rubrum* L. Thèse de doctorat, Lausanne, PP : 175.

Chirinos Rosana., Rogez Hervé., Campos David., Pedreschi Romina and Larondelle Yvan. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*. Vol 55(2): 217-225.

- Choi HJ., Kim JH., Lee CH., Ahn YJ., Song JH., Baek SH., Kwon DH. (2009).** Antiviral activity of quercetin 7- rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research*. Vol 81(1): 77 - 81.
- Chos D et Riche D. (2005).** Apports de sécurité en lipides chez le sportif a haut niveau d'entraînement. *Science & sports*. Vol 20(2): 74-82.
- Cocallemen S., Farines M., Faill H., Soulier J., Morin O. (1988).** Study of the seed oil of eggplant, *Solanum melongena* (L), Solanaceae. *Revue Française des corps gras*. Vol 35 (3): 105-10.
- Codex Stan 210. (1999).** Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique.
- Coleman MH. (1961).** Further Studies on the Pancreatic Hydrolysis of Some Natural Fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol 38(12): 685-688.
- Coleman MH. (1963).** The pancreatic hydrolysis of natural fats. III. The influence of the extent of hydrolysis on monoglyceride composition. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* Vol 40(10): 568-571.
- Collin Sonia et Crouzet Jean. (2011).** Polyphénols et procédés. Edition *TEC & DOC*. Lavoisier.
- Compaoré WR., Nikièma PA., Bassolé HIN., Savadogo A., Mouecoucou J., Hounhouigan DJ., Traoré SA. (2011).** Chemical Composition and Antioxidative Properties of Seeds of *Moringa oleifera* and Pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* Commonly used in Food Fortification in Burkina Faso. *Curr Res J Biol Sci*. Vol 3(1): 64-72.
- Dewanto V., Wu X., Adom K K. and Liu R H. (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. Vol 50 (10): 3010-3014.
- Dhalla NS., Temsah RM., Netticadan T. (2000).** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. Vol 18(6): 655-73.
- Di Domenico F., Foppoli C., Coccia R., Perluigi M. (2012).** Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphénols. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1822(5): 737-747.
- Di Mambro. Valéria M., Azzolini. Ana ECS., Valimb. Yara ML., Fonseca. Maria JV. (2003).** Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol 262: 93-99.
- Djeridane Amar. (2008).** Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales. Thèse

présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. École Normale Supérieure de Kouba-Alger, Algerie.

Dopico-García M S., Valentão P., Guerra L., Andrade PB. and Seabra RM. (2007). Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*. Vol 583(1):15-22.

Dufour Claire., Loonis Michèle. and Dangles Olivier. (2007). Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol 43(2): 241-252.

Dvorkin L., Song KY. (2002). Herbs for benign prostatic hyperplasia. *Ann Pharmacother*. Vol 36(9):1443-1452.

Dymock P. (2000). La quinzième conférence internationale sur le tournesol. *Oléagineux, Corps gras et Lipides (OCL)*. Vol 7(3):237-242.

Ekoumou Colette. (2003). étude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat. Université de BAMAKO (MALI).PP : 1-144.

El-Adawy TA., Taha KM. (2001). Characteristics and Composition of Water melon, Pumpkin, and Paprika Seed Oils and Flours. *J Agri Food Chem*. Vol 49(3): 1253-1259.

Elvira González de Mejía., Sonia Chandra., MarcoVinicio Ramírez-Mares and Wenyi Wang . (2006). Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 44 (8): 1191-1203.

Emmerie A., Engel C. (1939). Colorimetric détermination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments. *Rec. Trav. Chim*. Vol 58(4): 283-289.

Evangelos SL. (1992). Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. *Plant Food Hum Nutr*. Vol 42(3): 257-273.

Fahy E., Subramaniam S., Browen HA., Glass CK., AH Merrill JR., Merphy RC. (2005). A comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res*. Vol 46(5):839-861.

Fang Yung-Zhong., Yang Sheng., Wu Cuoyao. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *J. Nutr*. Vol 18: 872-879.

- FAO. (1993).** Plant oils; standards; quality. Report of the fourteenth session of the Codex Committee on Fats and Oils, London, United Kingdom, 27 September - 1 October, pp 461-462.
- Favier Alain. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*; pp108-115.
- Filomena Conforti., Giancarlo A. Statti. and Francesco Menichini. (2007).** Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*. Vol 102(4):1096-1104.
- Flanzy M., Dubois P. (1964).** The détermination of total tocopherols. Application to grape seed oil. *Technol. Agric.* Vol 13: 67-75.
- Frankel EN. (1993).** In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*. Vol 4(7): 220–225.
- Frenot M et Vierling E. (2001).** Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. Ed : Doin éditeurs, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux. France, 297 P.
- Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa MT. (2006).** Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.* Vol 99(3): 455-463.
- Gemrot F., Barouh N., Vieu JP., Pioch D., Montet D. (2006).** Effect of roasting on tocopherols of gourd seeds (*Cucurbita pepo*). *Grasas y aceites*. Vol 57(4): 409-414.
- Georgé S., Brat P., Alter P. and Amiot MJ. (2005).** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product. *J.Agric.Food Chem.* Vol 53 (5): 1370-1373.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. Vol 3(4):162-169.
- Giner-Chavez BI. (1996).** condensed tannins in tropical forages. These Ph. D. Cornell University, Ithaca, USA.
- Giorgia Spigno., Lorenza Tramelli and Dante Marco De Faveri. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. Vol 81(1): 200-208.
- Godon B. (1996).** Protéine végétale, collection science et technique Agroalimentaire. *Lavoisier, TEC et DOC*, 2^{ème} édition. Paris.

- Gohari A., Farhoosh R., Haddad Khodaparast MH. (2011).** Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*). Grown in Iran. *J Agri Sci Tech*. Vol 13(6): 1053-1063.
- Goiffon JP., Reminiac C., Olle M. (1981).** High-pressure liquid-chromatography application for fatty triglycerides analysis. 2. Retention parameters of triglycerides. *Rev. Franc. Corps Gras*. Vol 28: 199-207.
- Gravrilie M., Schwartz Gravriolov C., Wallach J., Maginat MJ. (1996).** Manipulation d'analyse biochimique. PP 157 168 collection dirigé par J. Figarella, F. Zonszain .
- Greenfield H., Southgate DAT. (2007).** Revue critique des méthodes d'analyse. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, p 107-162.
- Griendling KK., Sorescu D., Lassègue B., Ushio-Fukai M. (2000).** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Vol 20(10): 2175–83. [PubMed]
- Guingnard JL. (1996).** Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.
- Guingnard JL., Cosson L., Henry M. (1985).** Abrégé de phytochimie. Ed. Masson, Paris, 224 p.
- Gunstone FD. (1962).** the distribution of fatty acids in natural glycerides of vegetable origin. *Chem. Ind*. Vol 57:1214-1223.
- Gurbuz I., Yesilada E., Ito S. (2009).** An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* .Vol 121(3): 360 -365.
- Hadbaoui Z. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de Sorgho et de Mil de Ain Saleh. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. Université kasdi merbah- Ouargla. Algerie.
- Hadbaoui Z., Djeridane A., Yousfi M., Saidi M., Nadjemi B. (2010).** Fatty acid, tocopherol composition and the antioxidant activity of the lipid extract from the sorghum grains growing in Algeria. *Med J Nutrition Metab*. Vol 3: 215–220.
- Hae-Suk Kim ., Michael J Quon., Jeong-aKim. (2014).** New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *RedoxBiology*. Vol 2(1):187–195.
- Hagen Sidsel Fiskaa., Borge Grethe Iren Andersen., Bengtsson Gunnar., Bilger Wolfgang., Berge Arvid., Haffner Karin., Solhaug Knut Asbjørn. (2007).** Phenolic contents and other health and sensory

related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*. Vol 45(1):1–10.

Halliwell B. and Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology*. Vol 142(2): 231-55.

Hamia C. (2007). Contribution à la composition et à l'étude de l'huile du fruit de l'Arganier « *Argania spinosa* ». Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de magister en chimie. Université kasdi merbah ouargla. Algerie.

Hamia C. (2015). Investigation phytochimique du *Rhanterium adpressum* pour ses propriétés antioxydantes et antiradicalaires. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. Université kasdi merbah- Ouargla. Algerie.

Hamilton R.J., Rossel J.B. (1986). Analysis of Oils and Fats. Ed. Elsevier Applied Science Publisher. Londres. V.A, 155.

Hamilton R.J., Rossel J.B. (1986). Analysis of Oils and Fats. Ed. Elsevier Applied Science Publisher. Londres. V.B, 250.

Hayouni El Akrem., Abedrabba Manaf., Bouix Marielle and Hamdi Moktar. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. Vol 105(3): 1126-1134.

Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Tombelli S., Romani A. (2007). Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J. Agric. Food Chem.* Vol 55(5): 1724-1729.

Helme J.P., Chirouze J. (1984). Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, Application en Cosmétologie. Association Française de Cosmétologie. Symposium Bordeaux, 107.

Hitara T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D. (2009). Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol 17(1): 25- 28.

Hocman G. (1988). Chemoprevention of cancer: Phenolic antioxidants (BHT, BHA). *Int J Biochem.* Vol 20(7): 639–651.

Horpkins William G. (2003). L'organisation des plantes et des cellules végétales. In Physiologie végétale. Ed: boeck et larcier. Bruxelles, p 1-10.

- Howard M Merken and Gary R. Beecher. (2000).** Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J. Agric. Food Chem.* Vol 48 (3): 577–599.
- Hu FB. and Willet WC. (2002).** Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA.* Vol 288(20): 2569-78.
- Huang D., Ou B., Prior RL. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 53(6): 1841-1856. [Pub Med].
- Huang Xin-En., Hirose Kaoru., Wakai Kenji., Matsuo Keitaro., Ito Hidemi., Xiang Jin., Takezaki Toshiro., Tajima Kazuo. (2004).** Comparison of Lifestyle Risk Factors by Family History for Gastric, Breast, Lung and Colorectal Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* Vol 5(4): 419-427.
- Hubert Richard. (1998).** Biochimie de l'aliment, acides aminés et oligopeptides. *ENSIA.*
- Innis S M., Dyer R. (1997).** Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in formulafed piglets. *J Nutrition.* 127(7): 1311-1319.
- Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H. (2005).** Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry.* Vol 66(5): 567–572.
- Ito N., Fukushima S., Tsuda H. (1985).** Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Rev Toxicol.* Vol 15(2):109-50.
- Jacques-Henry Weil., bonnet J., boulangier Y., Chambon P., Dubertret G., Kedingier C., Lazdunski M., Montreul J., Patte JC., Robel G., Rossignol JM., Shechter E., Wright M. (2001).** Biochimie générale. 9^{ème} Edition, Dunod. France.
- Joaquín J Salas., Enrique Martínez-Force., Rafael Garcés. (2006).** Accumulation of phospholipids and Glycolipids in Seed Kernels of Different Sunflower Mutants (*Helianthus annuus*). *J Am oil Chem Soc.* Vol 83(6): 539-545.
- Kalkhambar RG., Kulkarni GM., Shivkumar H., Rao RN.(2007).** Sythesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti inflammatory and analgetic agents. *European journal of Medicinal chemistry.* Vol 42(10): 1272-1276.
- Kalogeropoulos Nick. and Tsimidou Maria Z. (2014).** Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants.* Vol 3(2): 387-413.

- Kamal-Eldin A., Andersson R. (1997).** A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc.* Vol 74(4): 375-376.
- Karleskind Alain. (1992).** Manuel des corps gras, Volume 1. *Technique et Documentation – Lavoisier.* 787 pages. France.
- Katan MB., Grundy SM., Jones P., Malcolm Law., Miettinen Tatu., Paoletti R. (2003).** Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.* Vol 78(8):965-78.
- Kim JY., Lim HJ., Lee DY., Kim DH., Jeon R., Ryu JH. (2009).** In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* Vol 19(3): 937 -940.
- Koechlin-Ramonatxo Christelle. (2006).** Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme.* Vol 20(4): 165-177.
- Kohen R., Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* Vol 30(6):620-50. [Pub Med].
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knezevic S. (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica.* Vol 54 (1): 65-72.
- Kubata BK., Nagamune K., Murakami N., Merkel P., Kabututua Z., Martin SK., Kalulug TM., Mustakuk H., Hoshida M., Ohnishi-kameyama M., Kinoshita T., Duszenko M., Uradea Y. (2005).** *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology.* Vol 35(14): 91- 103.
- Kubow S. (1996).** The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Nutritional Biochem.* Vol 7(10): 530-541.
- kuksis A. (1978).** Hand Book of Lipid Research : Fatty acids and Glycerides. *Ed. Plenum, New York.* Vol 1: 1- 76.
- Kune GA., Bannerman S., Field B., Watson LF., Cleland H., Merenstein D. (1992).** Diet, alcohol, smoking, serum beta-carotene, and vitamin A in male nonmelanocytic skin cancer patients and controls. *Nutrition and Cancer.* Vol 18(3): 237-44.
- Küpelı Esra and Yesilada Erdem. (2007).** Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol 112(3): 524-530.

- Laetitia Meot-Duros ., Gaëtan Le Floch., Christian Magné. (2008).** Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 116 (2): 258-262.
- Lagarde M. (2003).** Colloque sur les lipides de la peau métabolisme des lipides bio-actifs *.Pathologie biologie*. Vol 51(5) : 241–243.
- Lampe Johanna W. (1999).** Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*. Vol 70(3): 475s-490s.
- Léger Amandine. (2010).** Analyse fonctionnelle d'atmyb30, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis Thaliana*. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en interactions plantes-microorganismes. université de Toulouse. France.
- Lehucher-Michel MP., Lesgards JF., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale (.Bilan et perspectives préventives)*. Vol 30(21): 1076-1081.
- Lhuillier A (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria Salicifolia* Hook.F Ex Oliver, *Agauria Polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa Trichophylla* Baker (Monimiaceae) Et *Embelia Concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. France.
- Li F., Awale S., Tezuka Y., Kadota S. (2008).** Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure- activity relationship. *Bioorganic & Medicinal chemistry*. Vol 16(10): 5434 - 5440.
- Lopes-Lutz Daise., Dettmann Judith., Nimalaratne Chamila and Schieber Andreas. (2010).** Characterization and Quantification of Polyphenols in Amazon Grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius). *Journal Molecules*. 15 : 8543-8552.
- Luddy FE., Barford RA., Herb SF., Magidman P., Riemenschneider RW. (1964).** Pancreatic Lipase of Triglycerides by Semi micro Technique. *J Am Oil Chem Soc*. Vol 41(10): 693-696.
- Lusas EW. (1979).** Food Uses of Peanut Protein. Texas A and M University. College station, Texas. USA.
- Macheix JJ., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, pp 121-216.
- Maisuthisakul Pitchaon., Suttajit Maitree and Pongsawatmanit Rungnaphar. (2007).** Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*. Vol 100(4): 1409-1418.

- Mancebo-Campos V., Salvador MD., Fregapane G. (2014).** Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40°C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chem.* Vol 150:374-381.
- Marie-JosBphe Amiot, Annie Fleuriet, and Jean-Jacques Macheix. (1986).** Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* Vol 34 (5): 823-826.
- Markovic VV., Bastic LV. (1976).** Characteristics of Pumpkin Seed Oil. *J Am Oil Chem Soc.* Vol 53(1): 42–44.
- Masquelier J., Dumon M et Dumas J. (1979).** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique* 1, P : 101-104.
- Maurya R., Gupta P., Chand K., Kumar M., Dixit P., Singh N., Dube A. (2009).** Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani*. *Nat Prod Res in PubMed.* Vol 23(12): 1134-43.
- Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina DJ. (2009).** Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti inflammatoruy activity of Novel coumarin – 3 –aminoamides and their α -lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry.* Vol 44(7): 3020–3026.
- Mokrane Hind. (2010).** Valorisation des matières protéiques de céréales locales:Sorgho (*sorghum bicolor* (l.) moench) et Mil (*pennisetum glaucum* (l.) r. br). Thèse présentée pour l’obtention du diplôme de doctorat d’état en génie de l’environnement.Ecole national polytechnique - Algerie.
- Murkovic M., Mülleder U., Neunteufl H. (2002).** Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *Journal of food composition and analysis.* 15(6): 633-638.
- Nagavani V. and Raghava Rao T. (2010).** Evaluation of antioxidant potential and qualitative analysis of major polyphenols by rphplc in nymphaea nouchali brum flowers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 2(4) : 98-104.
- Naudet m. (1992).** Manuel des corps gras. Tome 1, Lavoisier. Paris.
- Noll JS., Simmonds DH and Busmuk W. (1974).** Modified Biuret Reagent for determination of protein. *J.A.O.C.S.* university of Manitoba, Winnipeg,Canada.
- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M., Takahara Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins andflavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry.* Vol 33(3): 557-561.

Olivier Sorg . (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. Vol 327(7):649-62. [Pub Med].

Palinski W., RosenfeldME., Yla-HerttualaS. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol 86: 1372- 1376.

Paquot C., Hautfenne A. (1987). Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th Revised and Enlarged Edition, Ed. Black Well Scientific Publication, Oxford.

Patel RP., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman JS., Darley-USmar VM. (2000). Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Center for Free Radical Biology*. Vol 28(12):1780-94. [Pub Med].

Perrin JL. (1992). Minor components and natural antioxidants in olives and olive oil. *Revue Française des Corps Grass*. Vol 39: 25-32.

Pilar Prieto., Manuel Pineda and Miguel Aguilar. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*. Vol 269(2): 223–433.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Home / Nutrition clinique et métabolisme*. Vol 16(4): 233-239.

Polnoveski M., Boulanger P., Polonovski J., Tayeau F., Mandel P et Biserte G., (1977). biochimie médicale, tome1. *Édition Masson*. Page 78-138.

Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. Vol12(3):221-8.

Ragae S., Abdel-Hal ESM., Noaman K. (2006). Antioxydant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food chem*. Vol 98(1): 32-38.

Raimundo N., Shadel GS. (2009). A“radical”mitochondrial view of autophagy related pathology. *Aging Journal*. Vol 1(4): 354 - 356.

Ranajit K Sutradhar., AKM Matior Rahman., Mesbah U Ahmad ., Sitesh C Bachar. (2008). Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry*. Vol1(4): 179 - 182.

Rangkadilok Nuchanart., Sitthimonchai Somkid., Worasuttayangkurn Luksamee., Mahidol Chulabhorn., Ruchirawat Mathuros and Satayavivad Jutamaad. (2007). Evaluation of free radical

scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 45(2): 328-336.

Rao YK., Fang SH., Hsieh SC., Yeh TH., Tzeng YM. (2009). The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 121(2): 292 - 296.

Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F F and Tattini M. (1993). Identification and quantification of polyphenols in Leaves of *Myrtus communis* L. *Chromatographia*. Vol 49(1-2): 17-20.

Sannomiya M., Fonseca VB., Da silva MA., Rocha LRM., Dos Santos LC., Hiruma-Lima CA., Brito ARMS., Vilegas W. (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 97(1): 1- 6.

Sari Pihlasalo. (2011). Quantification of Proteins and Cells. SARJA - SER. D OSA - TOM. 952 (MEDICA – ODONTOLOGICA). TURUN YLIOPISTON JULKAISUJA -ANNALES UNIVERSITATIS TURKUENSIS.

Savitree Mongkolsilp., Isara Pongbupakit., Nittaya Sae-Lee and Worapan Sitthithaworn. (2004). Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Medicinal Plants Used in Primary Health Care. *J Pharm Sci*. Vol. 9(1): 32-35.

Servais S. (2002). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en Oméga-3. Thèse de doctorat. Université de Claude Bernard. Lyon 1, France.

Shahin Sharif Ali., Naresh Kasoju., Abhinav Luthra., Angad Singh., Hallihosur Sharanabasava., Abhishek Sahu., Utpal Bora. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. Vol 41(1):1-15.

Shon HY., Son KH., Kwon CS., Kang SS. (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medical plants: *Morus alba Echinosophara koreesis Nakai*. *Phytomedecine*. Vol 11(7-8): 666 - 672.

Sidsel Fiskaa Hagen., Grethe Iren A. Borge., Gunnar B. Bengtsson., Wolfgang Bilger., Arvid Berge., Karin Haffner., Knut Asbjørn Solhaug. (2007). Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*. Vol 45(1):1-10.

Silva EM., Rogez H and Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. Vol 55(3): 381- 387.

- Singleton VL and Rossi JA. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol 16(3): 144–158.
- Smyth T., Ramachandran VN., Smyth WF. (2009).** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents.* Vol 33(5): 421 - 426.
- Srinivasan Rajgopal. and Rose George D. (1999).** A physical basis for protein secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 96(25): 14258–14263.
- Tahara S. (2007).** A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 71(6):1387-1404.
- Takebayashi J., Chen J., Tai A. (2010).** A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Methods Mol Biol.* Vol 594:287-96.
- Traber Maret G. and Atkinson Jeffrey . (2007).** Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radic Biol Med.* Vol 43(1): 4–15.
- Tripoli E., Guardia ML., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry.* Vol 104(2): 466 - 479.
- Turner PC., McLennan AG., Bates & MRH AD. (1985).** White, biologie Moléculaire. Chapitre B, p : 22-23.
- Vafeiadou Katerina., Vauzour David., Yi Lee Hung., Rodriguez-Mateos Ana., Williams Robert J., . Spencer Jeremy PE. (2009).** The citrus flavonone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Vol 484(1): 100–109.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions.* Vol 160,(1):1-40.
- Van Niekerk. P J. and Burger. AEC. (1985).** The Estimation of the Composition of Edible Oil Mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol 62:531–538.
- Veillet Sébastien. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l’huile d’olive :Entre Tradition et Innovation. Thèse présentée pour l’obtention du diplôme de doctorat en sciences. Université d’Avignon et des Pays de Vaucluse.

- Wang Lisu., Yen Jui-Hung., Liang Hsiao-Ling. and Wu Ming-Jiuan. (2003).** Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol 11(1): 60-66.
- Win NN., Awale S., Esumi H., Tezuka Y., Kadota S. (2008).** Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol16(18): 8653 - 8660.
- Wollgast J., Anklam E. (2000).** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. Vol 33(6): 423 - 447.
- Xu Shaoping , and Touyz Rhian M. (2006).** Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: Still alive. *Can J Cardiol*. Vol 22(11): 947–951.
- Yoshida H., Hirooka N. and Kajimoto G. (1990).** Microwave Energy Effects on Quality of Some Seed Oils. *J. Food Sci*. Vol 55(5): 1412–1416.
- Younis YMH., Seniat G., Al-Shihr SS. (2000).** African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*. Vol54(1): 71-75.
- Yousfi M. (2005).** Caractérisation de molécules lipidiques et phénoliques de pistachier de l'Atlas "Pistacia atlantica". Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. Université Saad Dahleb-Blida. Algerie.
- Yousfi M., Bombarda I., Hamia C., Djeridane A., Stocker P. and Gaydou E. (2009).** Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterr J Nutr Metab*. Vol 2:197–203.
- Yousfi M., Nadjemi B., Belal R., Bombarda I. and Gaydou E.M. (2005).** Triacylglycerol Composition of Oil from *Pistacia atlantica* Fruit Growing in Algeria. *JAACS*. Vol 82(2): 93-96.
- Yu R., Mandlekar S., Tony Kong AN. (2000).** Molecular Mechanisms of Butylated Hydroxyanisole-Induced Toxicity: Induction of Apoptosis through Direct Release of Cytochrome c. *Molecular Pharmacology*. Vol58(2) :431-437.
- Zhishen J., Mengcheng T. and Jianming W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. Vol 64 (4): 555-559.

Annexe 1

Tableau 1. Les principaux acides gras saturés.

Acides	Nom systématique	Symbole chimique	formule
Laurique	Dodécanoïque	C 12 : 0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Myristique	Tétradécanoïque	C 14 : 0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Palmitique	Hexadécanoïque	C 16 : 0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Stéarique	Octadécanoïque	C 18 : 0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Arachidique	Eicosanoïque	C 20 : 0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Behénique	Docasanoïque	C 22 : 0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Lignocérique	tétracosanoïque	C 24 : 0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂

Tableau 2. Les principaux acides gras insaturés.

Acides	Nom systématique	Symbole	formule
Myristoléique	Cis-9-tétradéca-noïque	C14 : 1	C ₁₄ H ₂₆ O ₂
Palmitoléique	Cis-9-hexadéca-noïque	C16 : 1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Oléique	Cis-9-octadéca-noïque	C18 : 1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Vaccénique	11-trans-octadé-canoïque	C18 : 1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Linoléique	Cis-9-cis-12-octa-décatriénoïque	C18 : 2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Linoléinique	Cis-9-cis-12-cis15-Octadécatriénoïque	C18 : 3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Arachidonique	Cis-5-cis-8-cis-11-cis-14-ecosapentaénoïque	C20 : 4	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Erucique	Cis-13- docasénoïque	C22 : 1	C ₂₂ H ₃₄ O ₂

Table 3. Composition des TAGs (%) totaux dans les huiles de graines de citrouille

	Coleman									Gunstone							
	Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)				Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)					Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)				Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)			
	81	82	83	84	91	92	93	94		81	82	83	84	91	92	93	94
ALL	1	-	-	-	0.74	-	-	-	A,L,L	1.1	-	-	-	0.78	-	-	-
AOL	0.76	-	-	-	0.50	-	-	-									
ALO	0.46	-	-	-	0.44	-	-	-	A,L,O	1.2	-	-	-	0.98	-	-	-
ALSt	0.24	-	-	-	0.18	-	-	-	A,L,St	0.31	-	-	-	0.23	-	-	-
AOO	0.34	3.5	-	-	0.30	7.30	-	-	A,O,O	0.34	-	-	-	0.31	-	-	-
AOSSt	0.18	-	-	-	0.12	-	-	-	A,O,St	0.17	-	-	-	0.14	-	-	-
AOP	0.24	-	-	-	0.16	-	-	-	A,O,P	0.28	-	-	-	0.19	-	-	-
ALP	0.34	-	-	-	0.24	-	-	-									
LPA	0.12	-	-	-		-	-	-	L,P,A	0.51	-	-	-	0.31	-	-	-
LLL	11.9	4.8	11.5	16.6	10.3	7.1	15.8	17.4	L,L,L	11.1	5	9.9	16.7	9.9	7.5	15.7	15.7
LLO	10.6	12.2	5.4	16.3	12.4	14	13.6	10.1									
LOL	8.7	-	5.8	7	6.9	-	3.8	6	L,O,L	18.3	15.4	10.1	23	18.8	16.7	16.4	14.7
LLSt	5.4	4.2	3.9	7.1	5.2	5.1	8.4	6.2									
LStL	0.32	0.13	0.45	-	0.41	0.36	0.69	1.1	L,St,L	6.1	4.3	4.7	7.1	5.9	5.8	9.5	8.1
LLP	7.8	6.5	11.4	9.7	6.6	7.33	13.4	7.6									
LPL	1.4	0.26	0.45	0.48	0.75	0.50	0.33	4	L,L,P	10	6.8	12.5	10.3	7.8	8.3	13.9	13.1
LLM	1.5	-	7.5	1.4	2.2	0.90	2.1	0.22			-						
LML	0.16	-	0.29	-	-	0.16	0.21	0.23	L,M,L	1.8	-	8.3	1.4	2.3	1.2	2.4	0.52
LLLa	-	-	2	-	0.22	-	-	5.7									
LLaL								0.32	L,La,L	-	-	2.2	-	0.22	-	-	6.3

[illegible]

POM	0.36	-	1.9	0.16	0.48	0.22	0.22		P,O,M	0.46	-	1.8	0.20	0.56	0.51	0.37	
OMP		-		-	-	0.20											
OPLa	-	-		-		-	-	0.38	O,P,La	-	-	0.48	-		-	-	0.84
POLa	-	-	0.50	-		-	-	0.42									
OMSt		-		-	-	0.14			O,M,St	0.28	-	0.67	0.14	0.42	0.35	0.26	0.28
StOM	0.26	-	0.64	0.12	0.38	0.16	0.14										
OLaSt	-	-		-	-	-	-	0.40									
StStP				-		0.14	0.16										
StPSt								0.13									
StPP	0.20	0.16		0.06	0.12	0.20		0.32									
PStP			0.11	-		0.10	0.12										
StPLa	-	-		-		-	-	0.24									
PStM		-	0.14	-													
PPP	0.15	0.12	0.11	0.04	0.08	0.15		0.19									
PPM		-	0.14														
PPLa	-	-		-		-	-	0.28									
PLaL	-	-		-	-	-	-	0.14									
MLM		-	1.2		0.11				M,L,M		-	1.7		0.13			
MLLa	-	-	0.66	-		-	-		M,L,La	-	-	0.93	-		-	-	0.11
MOM		-	0.62						M,O,M		-	0.59					
MOLa	-	-	0.34	-		-	-		M,O,La	-	-	0.32	-		-	-	
LaLLa								0.47	La,L,La	-	-	0.12	-		-	-	0.68
LaOLa	-	-		-		-	-	0.16	La,O,La	-	-		-		-	-	0.21
LaPLa	-	-		-		-	-	0.11									
Autres	1.44	0.32	2.78	0.34	1.58	0.84	1.37	1.06	Autres	0.64	0.31	0.06	0.19	0.77	0.26	0.17	0.42

Tableau 4. Méthode de Coleman pour le calcul de la composition triglycéridique
(Exemple : l'acide oléique en position 2)

Position- 2	%	Diglyceride	%	Triglyceride	%
-O-	40.05	PO 40.05*20.2/100	8.09	POP 8.09*20.2/100	1.63
				POSt 8.09*13.21/100	1.07
				POO 8.09*37.86/100	3.06
				POL 8.09*28.69/100	2.32
		StO 40.05*13.21/100	5.29	StOP 5.29*20.2/100	1.07
				StOSt 5.29*13.21/100	0.7
				StOO 5.29*37.86/100	2
				StOL 5.29*28.69/100	1.52
		OO 40.05*37.86/100	15.16	OOP 15.16*20.21/100	3.06
				OOS 15.16*13.21/100	2
				OOO 15.21*37.86/100	5.74
				OOL 15.21*28.69/100	4.35
		LO 40.05*28.69/100	11.5	LiOP 11.5*20.21/100	2.32
				LOSt 11.5*13.21/100	1.52
				LOO 11.5*37.86/100	4.35
				LOL 11.5*28.69/100	3.3

Les équations de la théorie de Gunstone

GS₂U

$$S'U'S''\% = 2S'S''U'X/S^2U$$

$$S'U'S'\% = S'^2U'X/S^2U$$

GSU₂

$$S'U'U''\% = 6S'U'U''(3U-100)/200U^2$$

$$S'U'U'\% = 3S'U'^2(3U-100)/200U^2$$

GU₃

$$U'U''U'''\% = 6U'U''U'''(3U-100)/400U^3$$

$$U'U''U''\% = 3U'U''^2(3U-100)/400U^3$$

$$U'U'U'\% = U'^3(3U-100)/400U^3$$

Où

GS₂U : Triglycéride di saturé

GSU₂ : Triglycéride mono saturé

GU₃ : Triglycéride tri insaturé

X : la valeur trouvée par la formule suivante :

$$X = (3S/20)^2 \text{ si } S < 66.66\%$$

Tableau 5. Les valeurs théoriques des quatre catégories des triglycérides

		Gunstone			
		GS ₃	GS ₂ U	GSU ₂	GU ₃
Huile de graines de citrouille (Récolte 2008)	81	/	12,86	45,71	40,0
	82	/	12,14	42,86	42,86
	83	/	23,57	47,14	24,28
	84	/	7,86	37,14	52,86
Huile de graines de citrouille (Récolte 2009)	91	/	11,43	41,43	43,57
	92	/	13,26	42,86	39,71
	93	/	14,28	44,29	37,86
	94	/	16,43	45,71	35,0

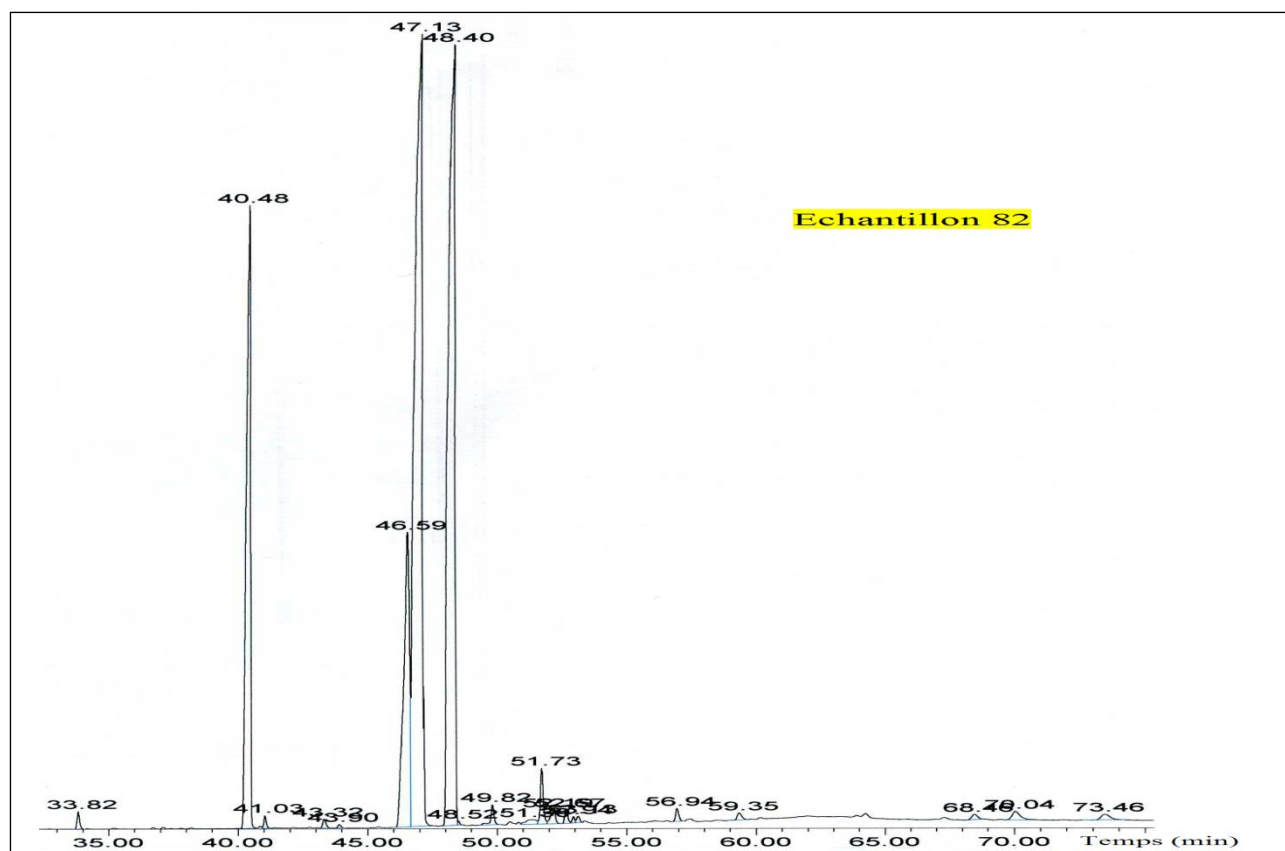
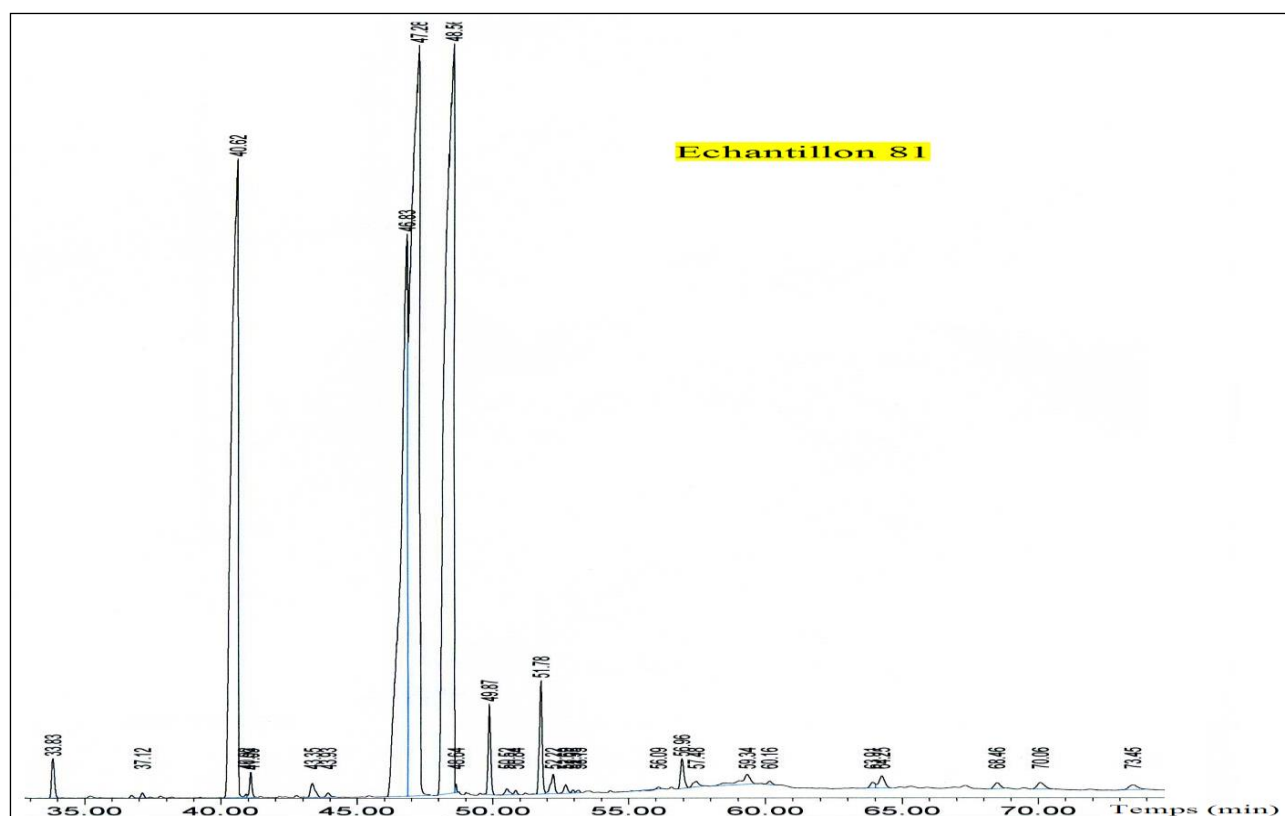


Figure 1. Chromatogrammes des EMAGs dans les huiles 81 et 82 de citrouille

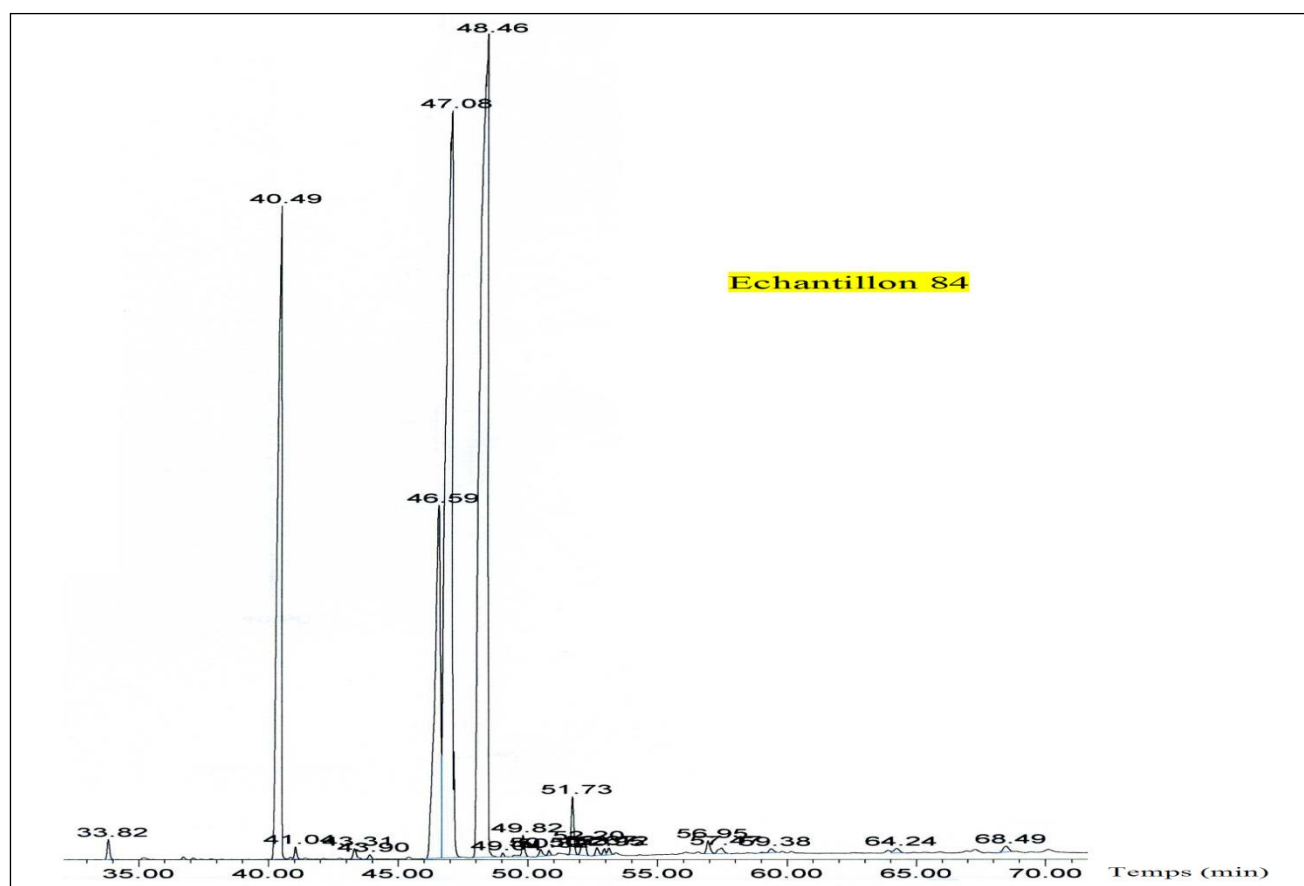
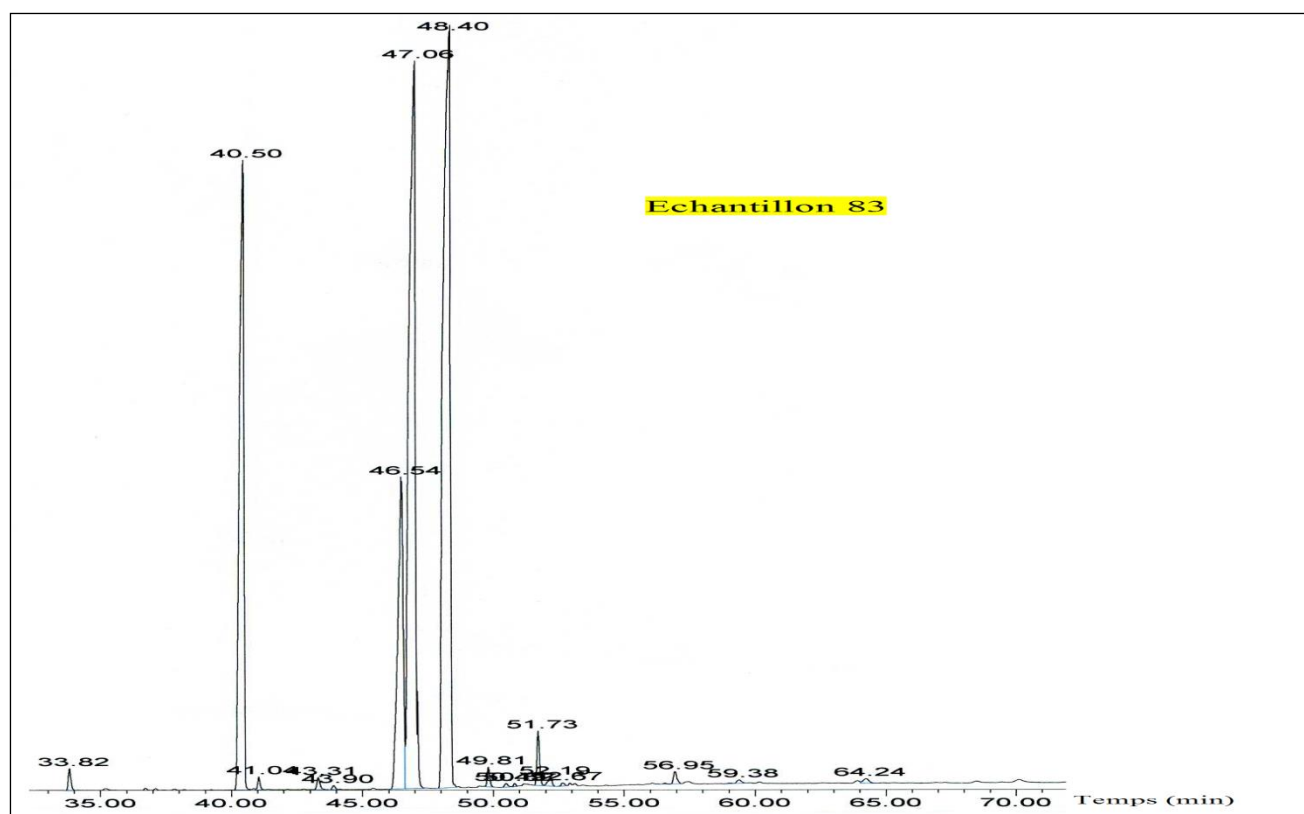


Figure 2. Chromatogrammes des EMAGs dans les huiles 83 et 84 de citrouille

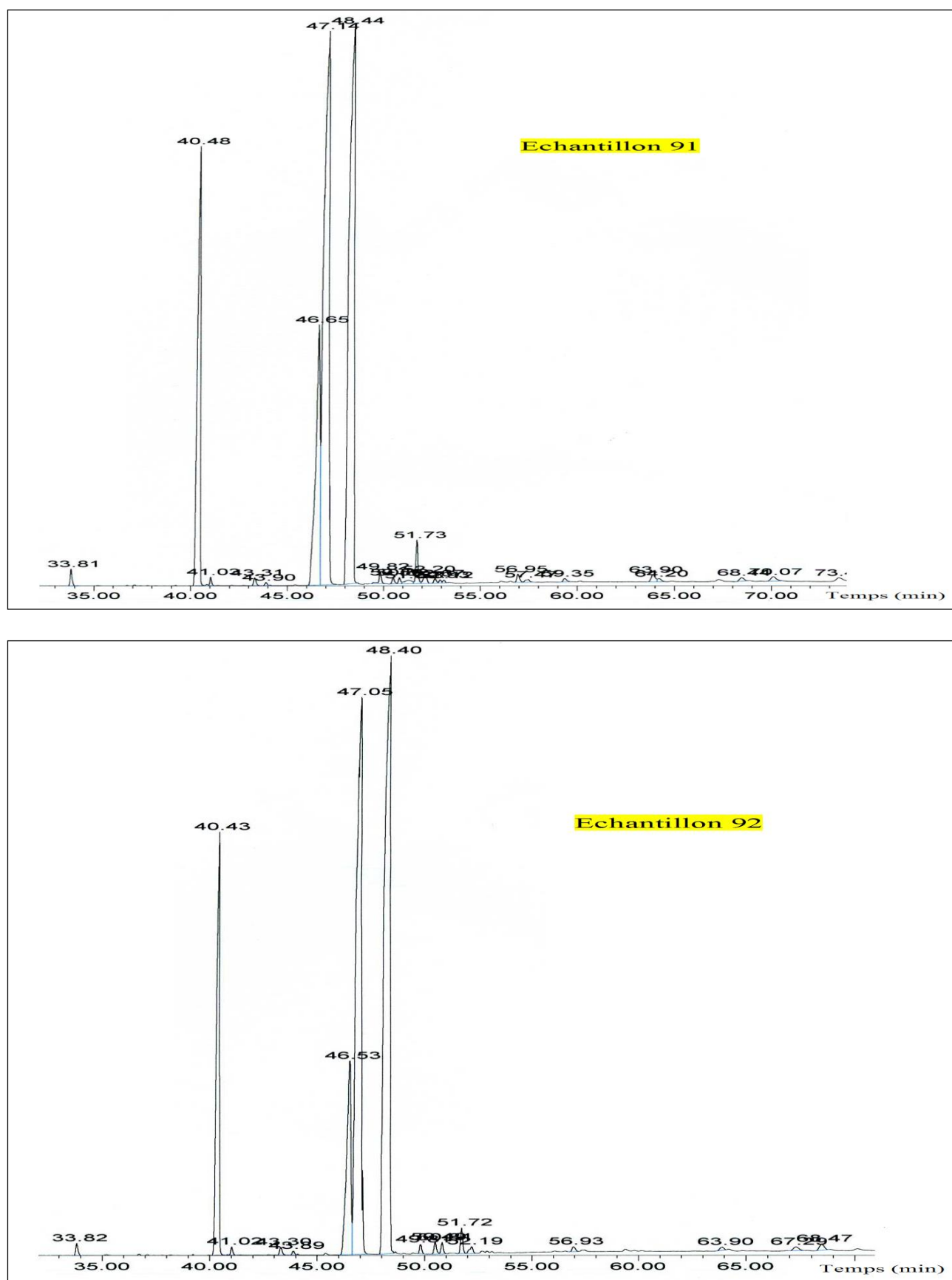


Figure 3. Chromatogrammes des EMAGs dans les huiles 91 et 92 de citrouille

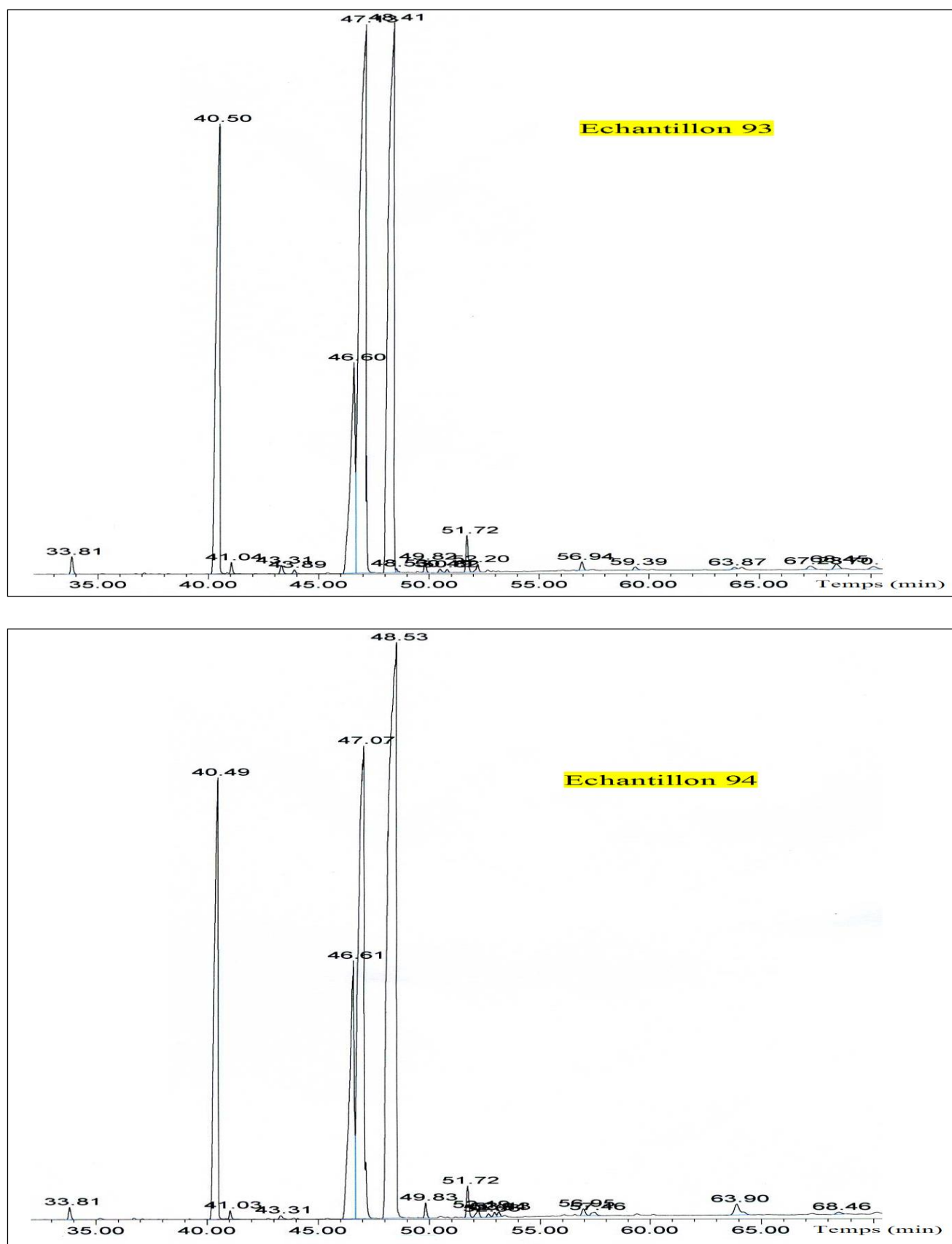


Figure 4. Chromatogrammes des EMAGs dans les huiles 93 et 94 de citrouille

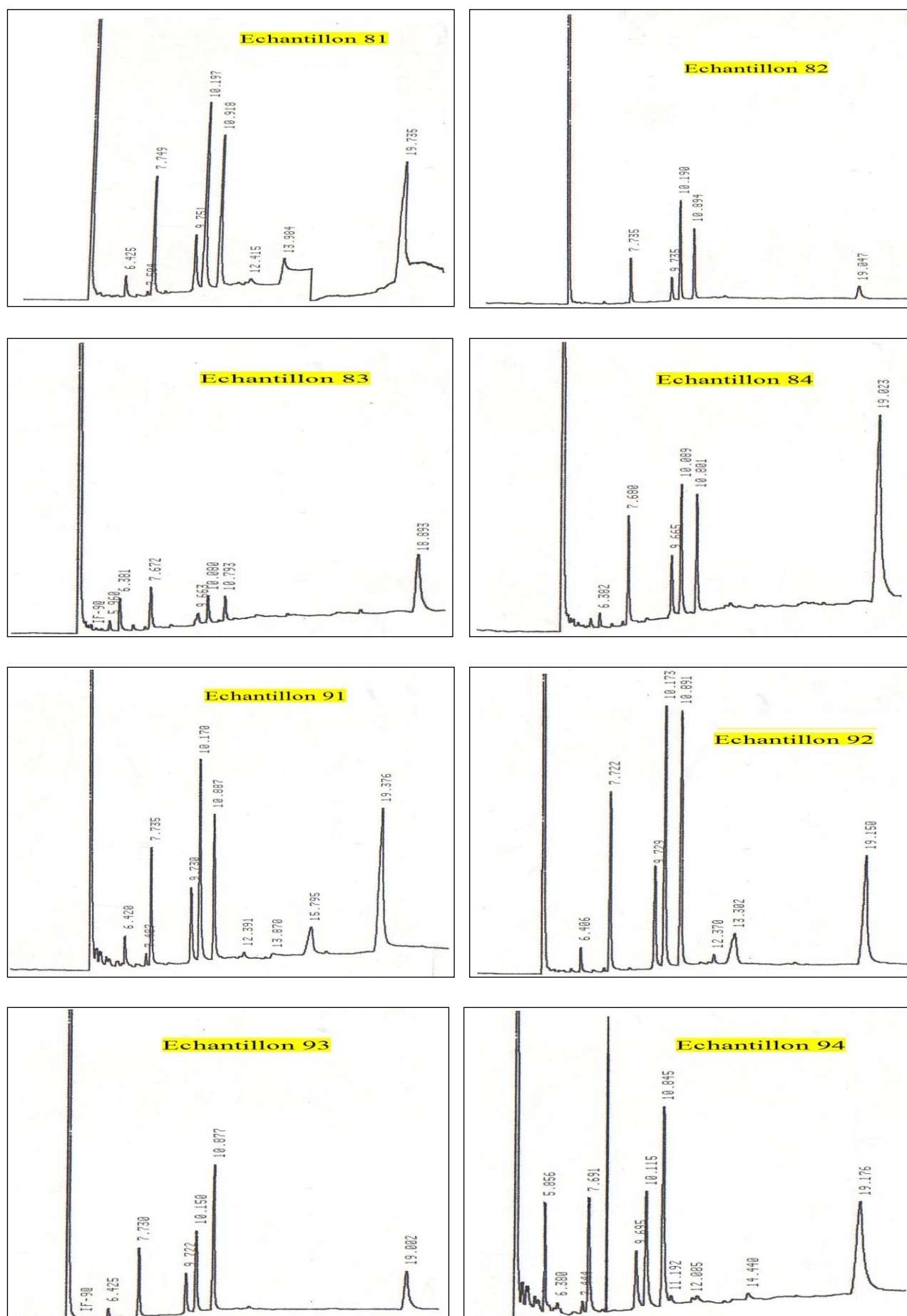


Figure 5. Chromatogrammes des TAGs des huiles étudiées de citrouille

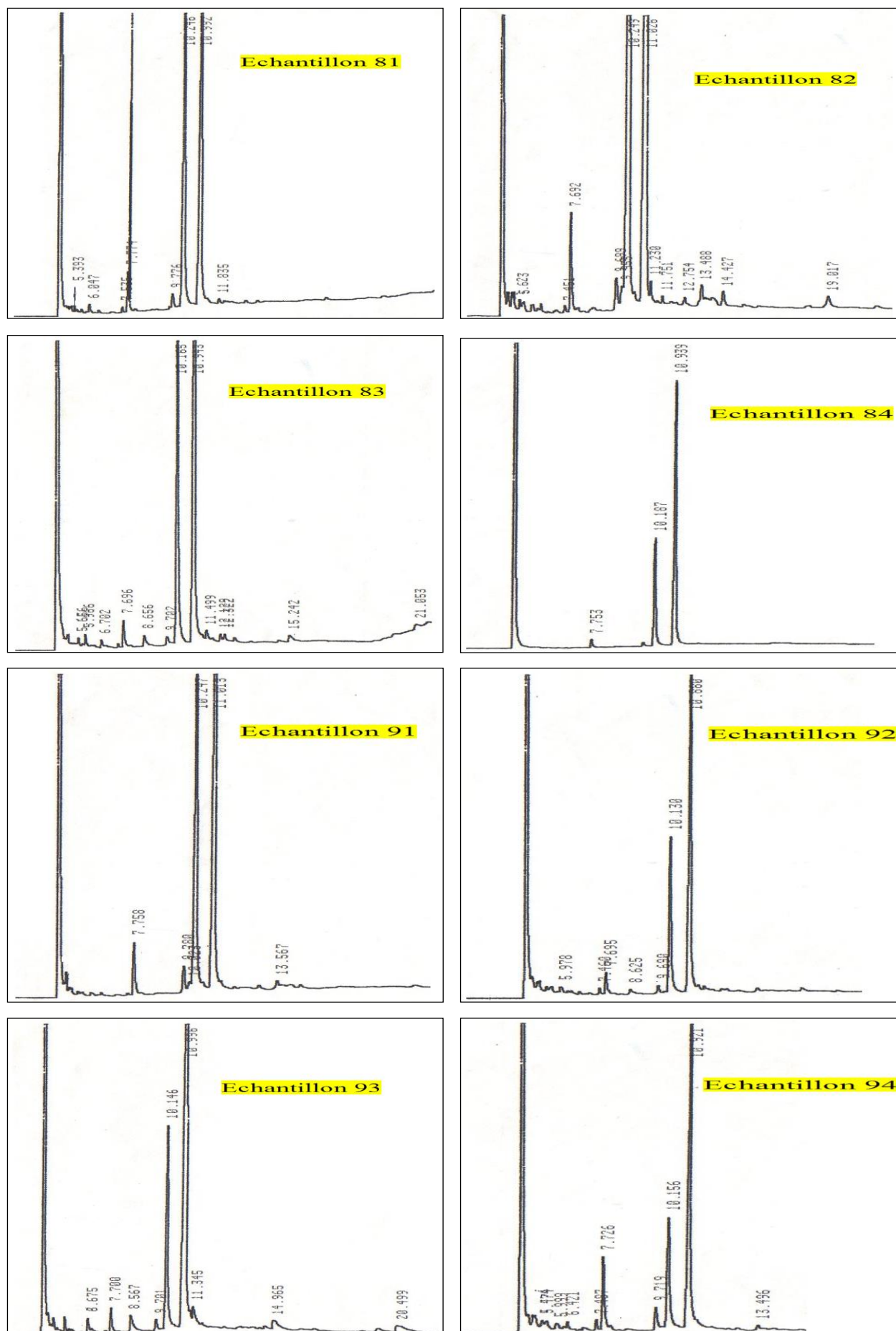


Figure 6. Chromatogrammes des 2-MAGs des huiles étudiées de citrouille

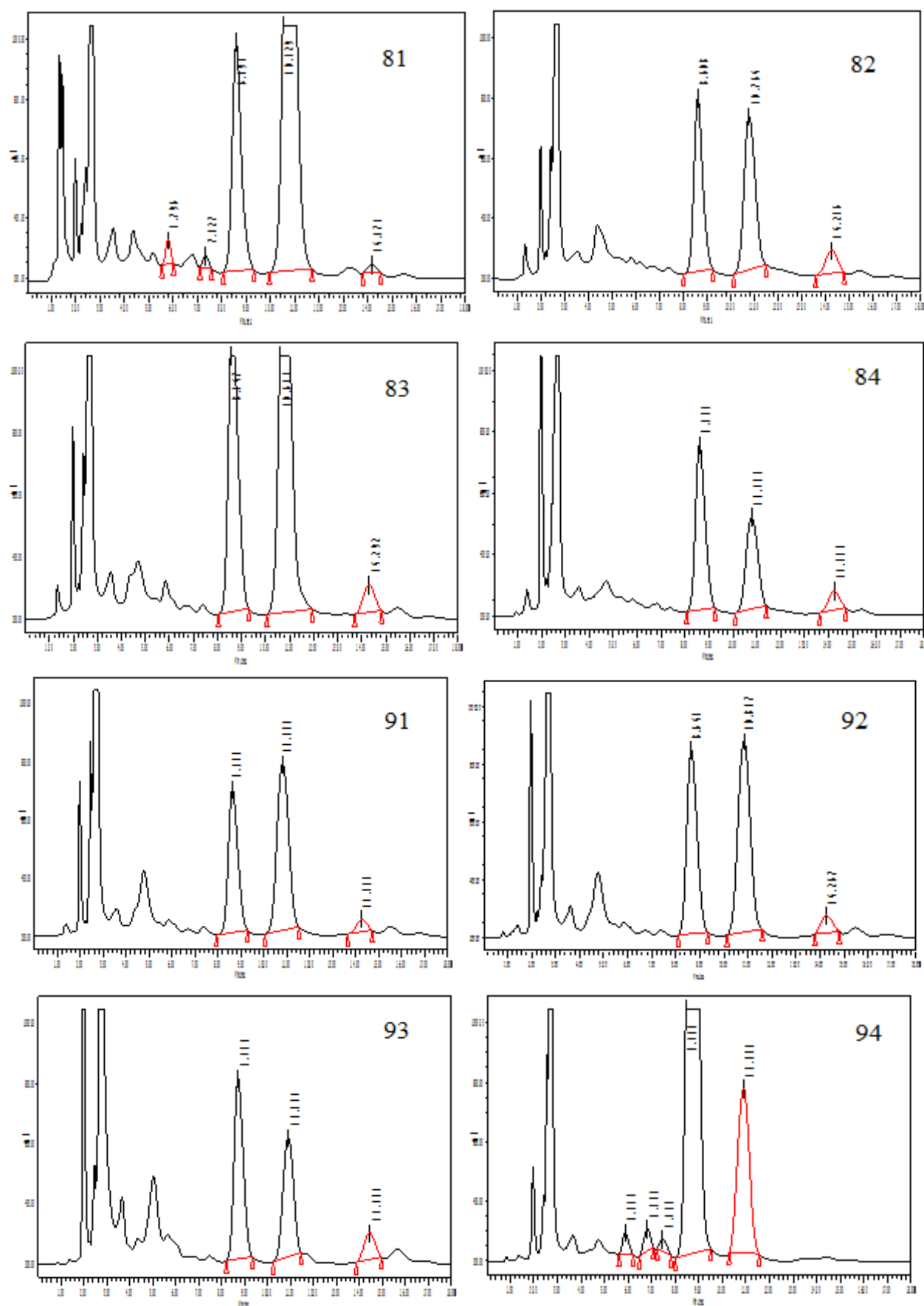


Figure 7. Chromatogrammes CLHP des tocophérols des huiles étudiées de citrouille

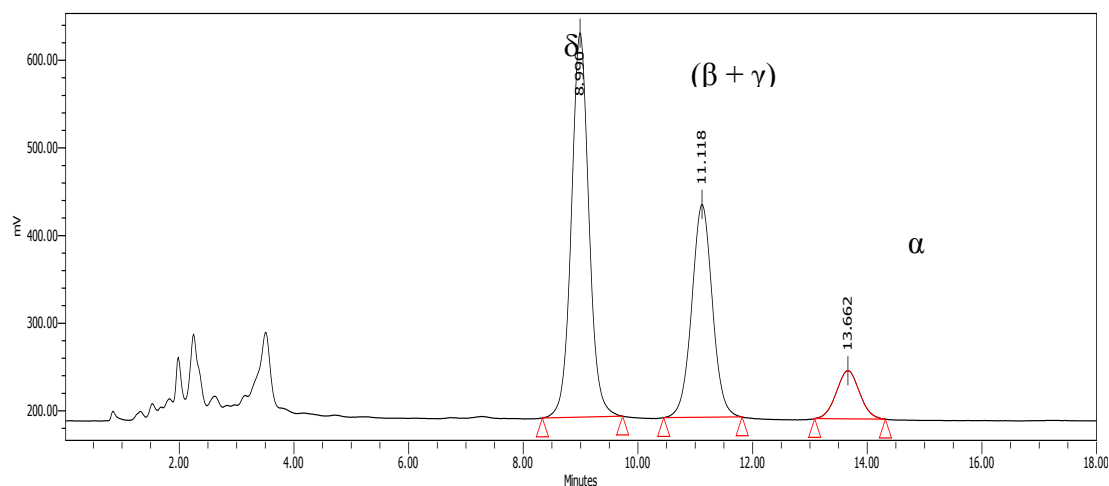


Figure 8. Chromatogramme CLHP des tocophérols standards

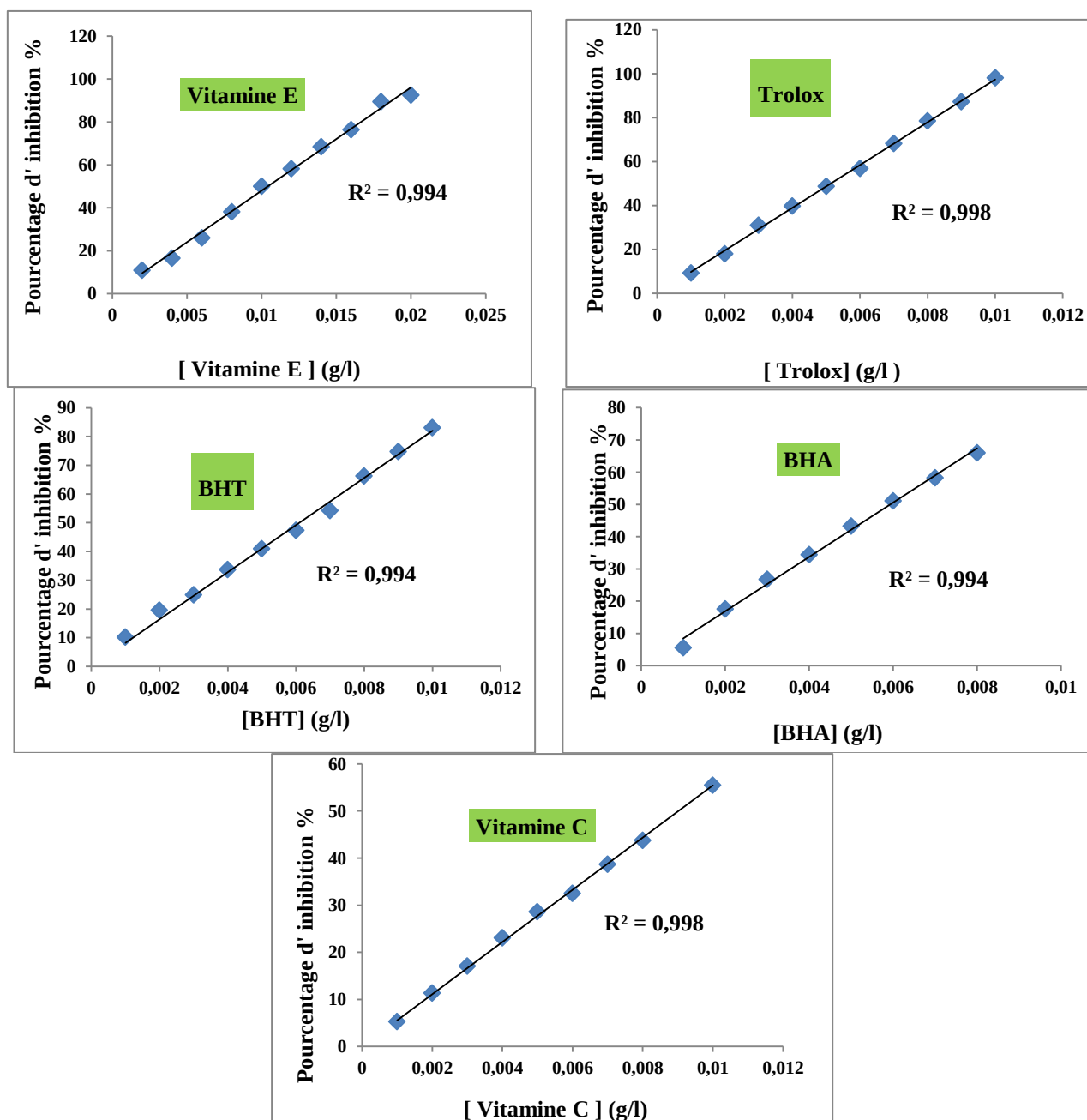


Figure 9. Activité antioxydante des standards dans le test du DPPH

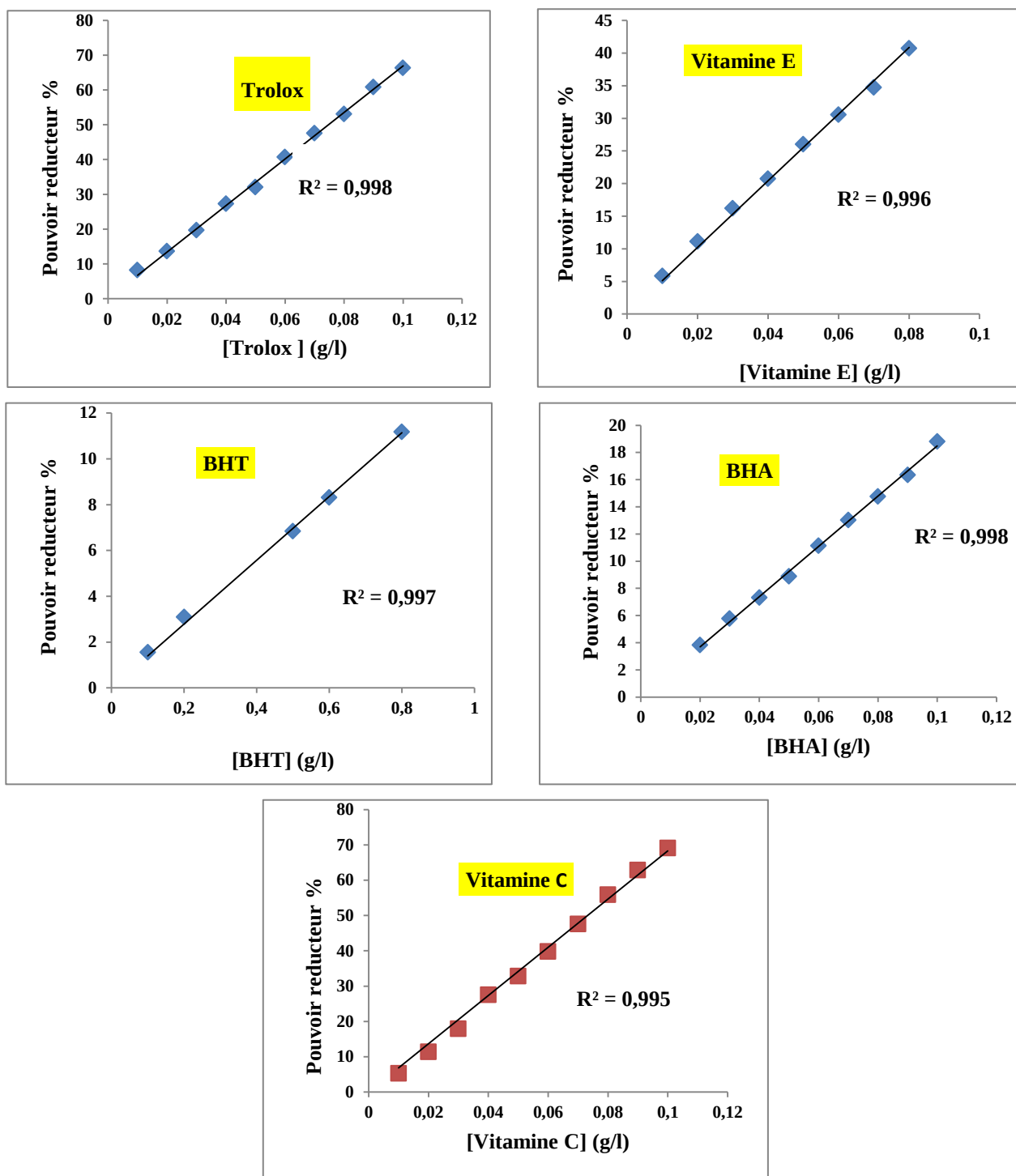


Figure 10. Activité antioxydante des standards dans le test du PPM

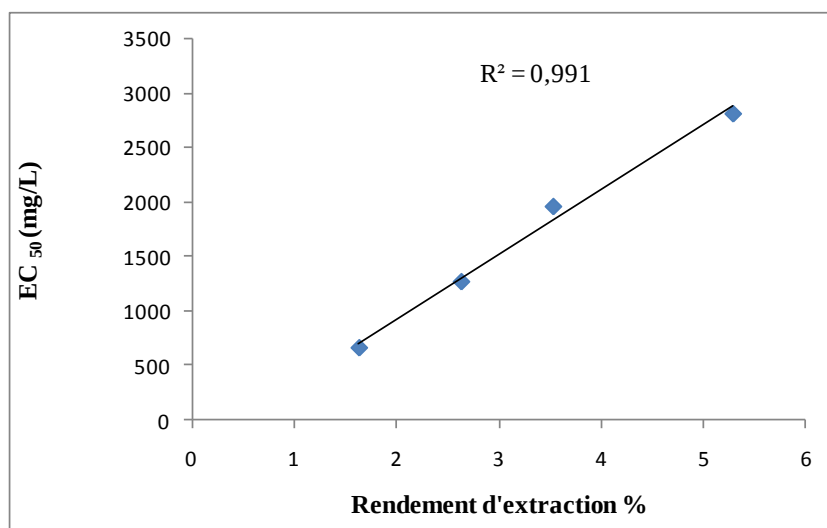


Figure 11. Variation des valeurs d' EC_{50} du test du DPPH en fonction du rendement d'extraction des ppolyphénols (récolte 2008 ; **Système : Acétone/Eau**)

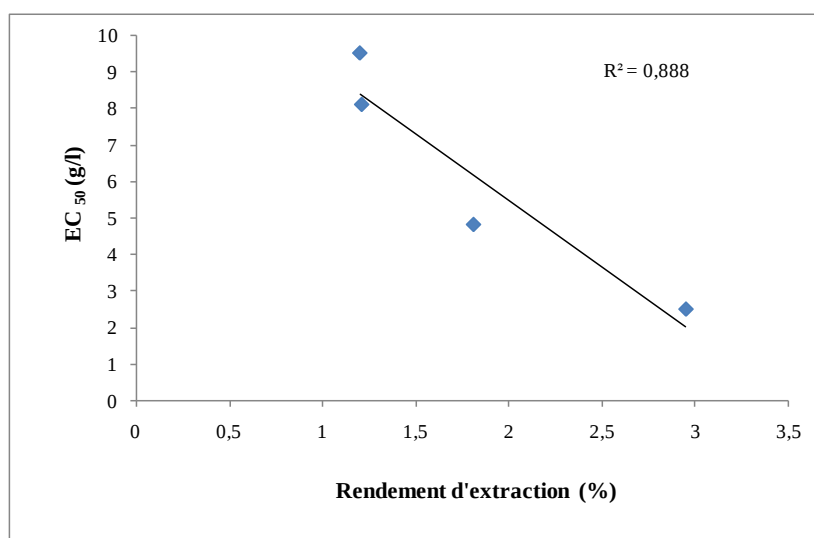
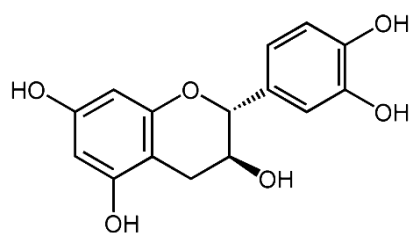
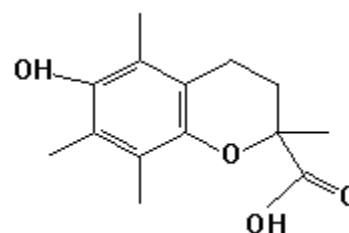
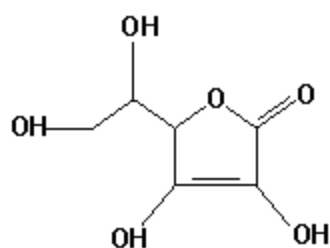
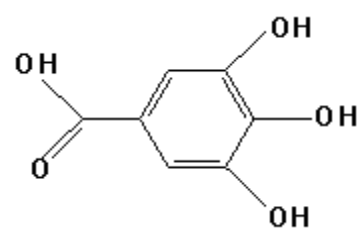
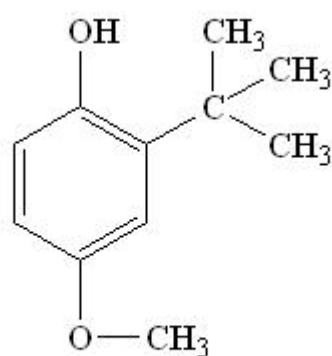
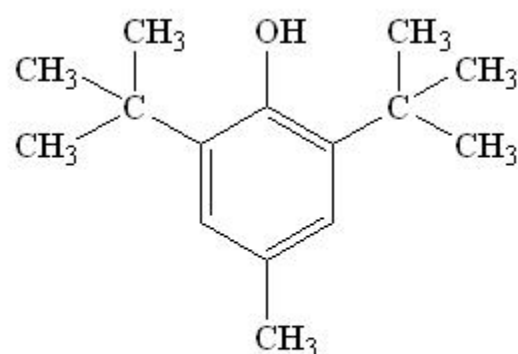
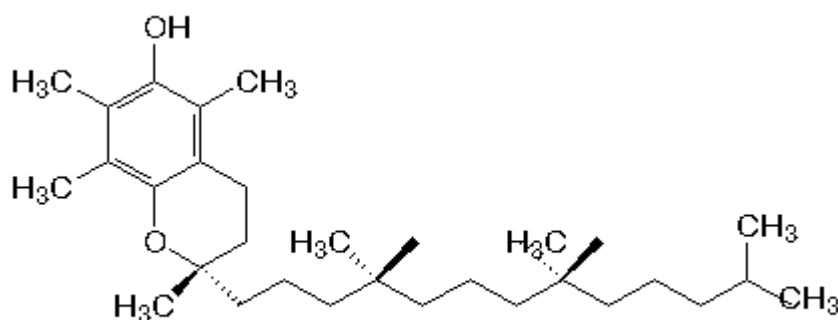


Figure 12. Variation des valeurs d' EC_{50} du test du PPM en fonction du rendement d'extraction des ppolyphénols (récolte 2008 ; **Système : MeOH/Eau**)

Annexe 2

**Catéchine****Trolox****Acide ascorbique****Acide gallique****3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)****2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluène (BHT)****Vitamine E (α-tocophérol)**