REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par :

Boukhorchef Hamid
Zaoui Hamza

Thème :

Contribution à la valorisation des biomolécules extraites à partir des graines de citrouille

Soutenue publiquement le : 21 /06 /2018., Devant le jury composé de :

Hadidi Noureddine	Grade : MCA	Université de Médéa	Président
Maachou Hamida	Grade : MCB	Université de Médéa	Examinateur
Madani Leila	Grade : MCB	Université de Médéa	Encadreur
Zouambia Yamina	Grade : MCA	Université de Médéa	Co-encadreur

Année universitaire 2017/2018

Dédicaces

A l'ame de mon père et mon grand-père, rabbi yarhamhoum

A ma mère que le tout puissant la protège

A mon frère: Hakim et mes sœurs

Am on cousin Yousef

A mon grand-mère

A ma tante

A mes fidèles amies: Houcoin, Billel, Moumen, Mounir, Mohamed et Sliman

Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux

Hamid

Dédicaces

A ma mère que le tout puissant la protège

A mon père que le tout puissant le protège

A mes frères et mes sœurs

A mon grand-mère

A mes fidèles amies: Zaki, Saddam, Chemso , Abdo Bourek.

Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux

Hamza

Remerciements

Tout d'abord louange a Dieu, Allah, le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage et la patience pour terminer ce mémoire

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mes promotrices, madame zouambia y et madani leila, qui ont su, à leur façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail

Je remercie vivement les membres de ce jury:

- *Monsieur Hadidi Noreddine : Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.*

- *Madame Maachou hamida : votre venue en tant qu'examinateur m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements*
- *Madame madani leila : qui ont su, à leur façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail*
- *Madame zouambia yamina : qui ont su, à leur façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail*

Mes remerciements sont adressés à remerciements Les membre de l'laboratoire

*Mes vifs remerciements s'adressent au mon cousin Yousef pour son aide et sa contribution a mon succès durant ma carrière scientifique. **Hamid***

Toutes mes salutations à tous mes collègues de la promotion de master 2018 pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements

Hamid et Hamza

الملخص

يهدف هذا العمل الى تثمين بذور القرع باستخلاص جزيئات البكتين و الزيوت العطرية. استخلاص البكتين تم في وسط حمضي في درجة حرارة عالية وذلك تحت شروط تجريبية مختلفة (الوقت- درجة الحرارة و طبيعة الحمض). احسن مردود (%) 5.5 تم الحصول عليه عند درجة حرارة 100 °و بعد 120 دقيقة من الاستخلاص. تتميز البكتينات المستخرجة بدرجة منخفضة من الأسترة (DE≤ 50٪) ووزن مرتفع مكافئ (≈ 1835 مجم / مول). يكشف التوصيف الفيزيوكيميائي القطارة التي تم الحصول عليهابواسطة التقطير المائي و التعطين الساخن وجود سوائل متحركة عديمة اللون تقريباً مع رائحة مميزة قوية. . هذهالقطارة تظهر تأثير مثبط على كل من سلالات Escherichia.Coli و Staphylococcus. يُقدّر أعلى محتوى فينول إجمالي بـ 8.45 (mg EAG / gMS) لسائل التعطين.

الكلمات المفتاحية:بذور القرع,البكتين , التقطير المائي,الزيوت العطرية ,نشاط مضاد للجراثيم

Résumé

Ce travail est une contribution à la valorisation des graines de citrouille par l'extraction des substances pectiques et des huiles essentielles. L'extraction des substances pectiques a été réalisée par voie acide à chaud sous différentes conditions opératoires (temps, température et nature d'acide). Le meilleur rendement (5.5%) a été obtenu à 100°C après 120min d'extraction. Les pectines extraites sont caractérisées par un faible degré d'estérification (DE≥50%) et un poids équivalent élevé (≈ 1835 mg/mol). La caractérisation physicochimique des hydrolats obtenus par hydrodistillation et par macération à chaud révèle la présence des liquides mobiles presque incolores de forte odeur caractéristique. Ces hydrolats montrent un effet inhibiteur sur les deux souches *Escherichia.Coli* et *Staphylococcus.*La meilleure teneur en composés phénoliques totaux est estimée à 8.45 (mg EAG/gMS) pour le liquide de macération.

Mots clés : Graines de citrouille, pectine, hydrodistillation, huile essentielle, activité antibactérienne

Abstract

This work is a contribution to the valorization of pumpkin seeds by the extraction of pectic substances and essential oils.The extraction of the pectic substances was carried out in by hot acid route under different operating conditions (time, temperature and nature of acid).The best yield (5.5%) was obtained at 100 ° C after 120min of extraction.The extracted pectins are characterized by a low degree of esterification (DE≥ 50%) and a high equivalent weight (≈ 1835 mg / mol).The physicochemical characterization of hydrolates obtained by hydrodistillation and hot maceration reveals the presence of almost colorless mobile liquids with a strong characteristic odor.These hydrolates show an inhibitory effect on both *Escherichia.Coli* and *Staphylococcus strains*.The highest total phenol content is estimated at 8.45 (mg EAG / gMS) for the maceration liquid.

Key words: Pumpkin seeds, pectin, hydrodistillation, essential oil, antibacterial activity

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE…….…….3

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Citrouille (*Cucurbitapepo*)……...…….3

I.1.1. Généralité sur les cucurbitacées ……...……3

I.1.2.Classification des cucurbitacées……..…….3

I.1.3. Généralité sur les Cucurbitapepo.....4

I.1.4.Description botanique de la citrouille.....5

I.1.5.Composition et utilisation de la citrouille 6

I.2. Les polysaccharides.....7

I.2.1. Définition.....7

I.2.2. Classification et utilisation 7

I.2.3. Les substances pectiques.....8

I.2.3.1. Définition.....8

I.2.3.2. Origine et structure chimique.....9

I.2.3.3. Types de pectines……....10

I.2.3.4. Caractérisation macromoléculaire de la pectine……...……10.

I.2.3.5.Extraction des pectines ……..…11

I.2.3.6. Propriétés des pectines……...…13

A. Solubilité des pectines……..……...13

B. Stabilité des pectines……...…….13

C. Propriétés gélifiantes……...…..……13

D.Propriétésviscosifiantes……....……..…14

I.2.3.7.Domaines d'applications des substances pectiques……...……..…14

A.Industrie alimentaire ……....……..…14

B.Industrie pharmaceutique ……...……..……..…15

C.Industrie cosmétique ……..……..…15

I.3. Les huiles essentielles……..……16

I.3.1. Historique……..……16

I.3.2. Définition ……..……16

I.3.3.Répartition systématique et lieu de synthèse……....…17

I.3.4. Composition chimique……..……18

I.3.4.1. Les terpènes……...….18

I.3.4.2. Les composés aromatiques……..…20
I.3.4.3. Les composés d'origine diverses……...…….20
I.3.5.Facteurs influençant la composition chimique……...……20
I.3.6. Propriétés physiques des huiles essentielles……...……21
I.3.7. Propriétés physiologiques……...…….22
I.3.8. Toxicité des huiles essentielles ……....……22
I.3.9. Champs d'applications des huiles essentielles……...……..…….23
I.3.9.1. Secteur parfumerie/ cosmétique ……....……23
I.3.9.2. Secteur parfumerie technique ……....…….23
I.3.9.3. Secteur alimentation ……..…23
I.3.9.4. Secteur médecine ……...…23
I.3.10. Procédés d'extraction des huiles essentielles ……....…24
I.3.10.1. La distillation ……...…24
A. Hydrodistillation ……...…25
B.Distillation à la vapeur ……..…26
I.3.10.2. Extraction par enfleurage……..…27
I.3.10.3. Extraction par les solvants volatils ……....…28
I.3.10.4. Extraction par expression ……....…28
I.3.10.5. Extraction au fluide supercritique ……....……29

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Introduction……..……31
II.2. Produits et matériels…….……...……31
II.3. Préparation du matériel végétal……...…….…31
II.4. Extraction des substances pectiques…….…..……..…32
II.4.1. Protocole expérimental……..32
II.4.2.Calcul du rendement d'extraction de pectine……...…….…34
II.4.3. Analyse et caractérisation physicochimique des pectines extraites……...…….34
II.4.3.1. Test organoleptique……....34
II.4.3.2. Solubilité de la pectine dans de l'eau froide et chaude……...…….34
II.4.3.3.Détermination du poids équivalent (EqW)……...……34
II.4.3.4.Détermination de la teneur en méthoxyle (MeO%)……...……..34

II.4.3.5. Détermination de la teneur en acide anhydrouronique total (AUA)…….....…….35
II.4.3.6.Détermination du degré d'estérification (DE)……..…….....……35
II.4.3.7. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier…….....35
II.5. Extraction des huiles essentielles……....…..……..36
II.5.1. Protocol expérimental……...……..……..36
II.5.2. Caractérisations de l'hydrolat…….....…….……37
II.5.2.1. Densité……...…….……37
II.5.2.2. Indice de réfraction……..……...……38
II.5.2.3. Tension superficielle……..……38
II.5.2.4. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie……...……...……..38
A.Principe……..……..……39
B.Mode opératoire……....……..……39
C.Calcul…….……..……..……39
II.5.2.5. Activité antibactérienne……..……..……40
A.Principe……..……..……40
B.Mode opératoire……...…..……..……..41
C.Lecture des résultats…….……....……..……..41

Chapitre III : résultat et discussion

III.1. Caractérisation des substances pectiques ……....…….....…….…….42
III.1.1. Aspect général…….…….....…..…...…….42
III.1.2. Rendement en pectine.....42
III.1.3. Solubilité de la pectine dans l'eau…….…….44
III.1.4. Poids équivalents……...……...……..…44
III.1.5. Teneur en méthoxyle…….…….....……...…45
III.1.6. Teneur en acide anhydrouronique total (AUA) …….……46
II.1.7.Degré d'estérificati…….……46
III.1.8. Spectroscopie FTIR ……...…….47
III.2. Rendement en huiles essentielles ……..…..49
III.3. Caractérisation des hydrolats……..50
III.3.1. Aspect organoleptique…….……50
III.3.2. Densité…….51
III.3.3. Indice de réfraction…….……51

III.3.4. Le pH……...…51
III.3.5 Activité antibactérienne……51
III.3.6. Polyphénols totaux par colorimétrie……..……..……53
Conclusion générale…….……...…..55
Références bibliograpgiques…….....……..……57

Liste de figure

Chapitre I : synthèse bibliographique

Figure I.1 : Echantillon de Cucurbita……..……4

Figure I.2 : Citrouille …….……4

Figure I.3: Structure de la pectine……9

Figure I.4: Déférentes étapes d'extraction de la pectine…….12

Figure I.5 : Exemple des composants monoterpéniques.....19

Figure I.6 : Exemple des composants sesquiterpéniques**.**.....19

Figure I.7 : Exemple des composants diterpéniques.....20

Figure I.8 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile.....26

Figure I.9 : Appareillage utilisé pour l'entrainement à la vapeur d'eau**.....**.....27

Figure I.10: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique……30

Chapitre II : Matériels et méthodes

Figure II.1 : Graines de citrouilles……...32

Figure II.2 : Poudres des graines de citrouille…….32

Figure II.3 : Protocole d'extraction de la pectine par voie acide……33

Figure II.4 : Dispositif expérimental d'hydrodistillation……37

Figure II.5 : Réfractomètre ……38

Figure II.6 : Différentes étapes de dosage des polyphénols totaux……40

Chapitre III : résultat et discussion

Figure *III .1* : hydrolat extrait……43

Figure *III.2 :* *la coloration des extraits*……..…….....43

Figure *III.3* : Teneur en polyphénols d'hydrolat, liquide de macération, hydrolat de macération et l'huile……..…….... 48

Figure *III.4 :* *Spectre FTIR de la pectine extraite par H2SO4 à 100°C pendant 60min*…..…..48

Figure *III.5 :* Hydrolat extrait des graines de citrouille……..50

Liste des tableaux

Chapitre I : synthèse bibliographique

Tableau I.1 : Description botanique de la citrouille……..**5**

Tableau I.2 : Différents nutriments de la citrouille……6

Tableau I.3.Exemples des polysaccharides courants……..……8

Tableau II.3 : Teneur en substances pectiques de quelques végétaux……10

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau II.1. Produits et matériels…….……..31

Chapitre III : résultat et discussion

Tableau III .1 : les caractéristiques de notre hydrolat extrait…….……44

Tableau III .2 : indice de réfraction des extraits…..……45

TableauIII .3 : la densité des extraits……...…45

Tableau III .4 : Activité antibactérienne.....…...46

Tableau III .5 : l'absorbance et la concentration des extraits…….…….47

Tableau III .6: la concentration des polyphénols totaux…….……50

Tableau III .7 : Densité des hydrolats…….51

Tableau III .8 : Indices de réfraction des hydrolats des graines de citrouilles……...51

Tableau III .9 : Diamètre et % d'inhibition des souches bactériennes testées pour les hydrolats des graines de citrouilles……..52

Tableau III .10: Teneurs en polyphénols totaux des hydrolats des graines de citrouilles……..….54

Introduction générale

Introduction générale

Les cucurbitacées ont été cultivées pendant longtemps non seulement pour la nutrition mais aussi pour leurs propriétés médicinales. Elles 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.

En Algérie, la citrouille a été largement cultivée dans plusieurs grandes régions 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, qui concernent principalement des variétés non-spécifiques. Cependant, peu d'études ont s'intéressées de la composition chimique en acides gras, carbohydrates et phénols et les propriétés antioxydantes des graines de citrouille algériennes.

Récemment, une attention accrue a été portée sur l'utilisation des déchets (co-produits) provenant de la transformation des aliments pour produire des composés à valeur ajoutée. Les graines de *Cucurbita pepo* qui restent en grande quantité en tant que produit résiduel après l'élimination de la chair pouvait être utilisé comme matière première pour l'extraction de diverses biomolécules.

C'est dans cet ordre d'idée que nous avons initie le sujet qui nous a été proposé sur l'extraction des substances pectiques par voie acide à chaud et les huiles essentielles par hydrodistillation à partir des graines de citrouilles.

Vu l'originalité du domaine et la complexité de sa maîtrise, une recherche bibliographique a été soigneusement étudiée, cette dernière nous a permis de sélectionner les données nécessaires sur les graines de citrouilles.

Par voie de conséquence, la première partie de cette étude est consacrée à une synthèse bibliographique. Celle-ci regroupera les points suivants :

- Généralités sur les citrouilles
- Aperçu sur les substances pectiques

- Rubrique bibliographique sur les huiles essentielles

La deuxième partie qui sera dédiée à l'aspect pratique de ce travail regroupe deux volets :

- Extraction des substances pectiques à partir des graines de citrouilles et leurs éventuelles caractérisations.
- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation à partir des graines de citrouilles et leur caractérisation physicochimique.

Enfin, ce cette étude, se termine par une conclusion générale et quelques perspectives.

***Cucurbita pepo*)**

Généralité sur les cucurbitacées

Les Cucurbitaceae (Cucurbitacées) sont une famille de plantes dicotylédones de l'ordre des Cucurbitales, originaires pour la plupart des régions tropicales et subtropicales, qui comprend environ 800 espèces réparties en 130 genres. Il s'agit de plantes herbacées plus ou moins rampantes ou grimpantes, originaires des régions tempérées chaudes à tropicales. Elles sont apparues sur le continent américain vers 6000 av. J.C. et leur culture s'est aujourd'hui étendue à tous les continents [1]. Depuis leur apparition, 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) [2].

Les Cucurbitacées sont des plantes herbacées, parfois sous-ligneuses à la base ou plus rarement ligneuses, annuelles ou vivaces. Elles sont plus ou moins rampantes ou grimpantes (voire décombantes) grâce à des vrilles caulinaires spiralées (à la base du pétioles placées à l'équerre du plan tige-feuille) [1].

Classification des cucurbitacées

La famille des cucurbitacées comprend environ 130 genres différents, eux-mêmes divisés en 800 espèces **[3]**. Parmi eux on distingue le genre cucurbita (Figure I.1). Ce genre comprend treize espèces, dont cinq sont cultivées pour l'alimentation :

- Cucurbita maxima : cette espèce rassemble plusieurs variétés dont le potiron, le potimarron et le giraumon
- Cucurbita moschata : nom botanique de la courge musquée et de la courge butternut
- Cucurbita pepo : nom botanique commun à la citrouille, au pâtisson, à la courge spaghetti et à la courgette

Dans cette présente étude on s'intéressera à l'espèce Cucurbita pepo communément appelée citrouille.



Figure I.1 : Echantillon de Cucurbita

Généralité sur les Cucurbita pepo

Toutes les espèces de courges viennent d'Amérique. L'espèce *Cucurbita pepo,* à laquelle appartiennent la citrouille, la courgette, le pâtisson et la courge à la moelle, a probablement été domestiquée dans le nord du Mexique, il y a 8 000 à 10 000 ans.

Étymologiquement, « citrouille » dérive du latin *citreum,* citron, par analogie de couleur. 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 », par allusion à la couleur du fruit.

Il s'agit de l'espèce la plus répandue. Elle comprend notamment certaines variétés de citrouilles, les courgerons, les courgettes, les courges spaghetti, les pâtissons et les patidous. Les petites coloquintes décoratives aux formes très variées et souvent bicolores jaune et vert, les deux couleurs étant séparées par une ligne horizontale nette, sont des formes de cette espèce.

La citrouille est ronde, avec une peau lisse -ou parfois couverte de « verrues » - dure et orangée, sa chair est jaune-orangé, sèche et sucrée (voir figure I.2). Le fruit peut peser de 15 à 50 kg.



Figure I.2 : Citrouille

Description botanique de la citrouille

La description botanique de la citrouille est résumée dans le Tableau I.1 [2].

Tableau I.1 : Description botanique de la citrouille

Description de la plante, du fruit et de graines	Photo
La plante Ordre : Cucurbitales Famille : Cucurbitaceae Genre : Cucurbita Nom vernaculaire : Calebasse Nom français : Citrouille Nom latin : Cucurbita pepo Nom arabe : الدِّقطين	
Caractères 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)	 

Composition et utilisation de la citrouille

La citrouille se compose d'une coque supérieure, de pulpe et des graines. Cork ou de l'écorce dure représente environ 17% du poids total de la citrouille, la chair jusqu'à 75% et les graines ne prennent pas plus de 11%.

La valeur nutritionnelle estimée pour 100 g de citrouille est donnée le Tableau I.2.

Les avantages de la citrouille pour le corps humain est difficile à surestimer. Elle est une source naturelle de la masse de nutriments et de minéraux. Les pulpes de citrouille contiennent de nombreuses vitamines importantes [4].

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 [5].

Les graines de Cucurbita pepo contiennent une quantité élevée de phytostérols. Ces composés sont reconnus pour leurs bienfaits sur la santé cardiovasculaire [6] et leurs effets potentiellement bénéfiques dans la prévention de certains cancers [7]. 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 [8].

Les graines de citrouille sont riches en acides gras oméga 3 et fortifient le système immunitaire, en plus ils aident à combattre l'arthrite et les processus inflammatoires [9]. Grâce à leurs grandes quantités en zinc, les graines de citrouille sont considérées comme un des apports les plus utiles pour l'organisme.

Tableau I.2 : Différents nutriments de la citrouille [9]

Nutriments	Quantités
Protéines	1.1 g
Lipides	0.13 g
Glucides	4.59 g
Eau	91 g
Fibres	2.16 g
Vitamine C	12 mg
Vitamine A	128 µg
Vitamine E	1.1 mg
Vitamine B1	0.05 mg
Phosphore	44 mg
Magnésium	8 mg

La richesse de la citrouille en glucides, fibres et lipides rend ce fruit comme une source végétale importante pour l'extraction des polysaccharides et lipides.

Dans cette présente étude, on s'intéressera principalement aux substances pectiques comme exemple de polysaccharides et les huiles essentielles comme matières graisses.

Les polysaccharides

Définition

Les polysaccharides qui sont appelés les polyosides ou les glucanes sont de langues chaînes polymères de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques pour avoir la configuration α ou β, et sans taille moléculaire définit. Ces chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées. Ils sont composés de plus de dix polysaccharides pouvant compter plusieurs milliers d'unités et avoir des poids moléculaires considérables [10].

Les polysaccharides sont retrouvés dans les algues, les plantes ou synthétisés par des microorganismes qui produisent respectivement l'alginate, l'amidon et la gomme xanthane. Les B-glucanes sont une famille de polysaccharides retrouvées dans plusieurs sources différentes (plante, champignon, levure, etc.) qui sont largement étudiées. Ces derniers possèdent tous la même caractéristique structurale soit d'être majoritairement composés de 3-D-glucose mais le type de liaison glycosidique et leurs poids moléculaires diffèrent grandement [11].

Classification et utilisation

On distingue deux types de polysaccharides [12] :

- Les homopolysaccharides dans lesquels le même résidu de sucre est répété des centaines ou des milliers de fois, conduisant à des macromolécules de masse moléculaire importante (104 à 106) et qui portent des noms qui dérivent de leur sucre constitutif.
- Les hétéropolysaccharides présentent 2 ou plusieurs types de monosaccharides. Les polysaccharides peuvent être classés selon leurs origine (animale ou végétale) ; leur nature soit de réserve (comme l'amidon) ou structurale (comme la cellulose) ; la présence d'amidon (polysaccharides non amylacés PNA ou amylacés) ; leurs solubilités dans l'eau ou leurs digestions dans le système gastro-intestinal humain.

Les polysaccharides sont utilisés comme épaississants, stabilisants, agents de suspension, agents gélifiants, agents filmogènes, agents d'aération, floculants, liants, émulsifiants, lubrifiants, agents texturants et de structuration [13].

Le tableau I.3 donne des exemples des polysaccharides les plus courants.

Tableau I.3. Exemples des polysaccharides courants [13]

Sources	Polysaccharides
Animale	***Glycosaminoglycane:*** ➢ Chitine ➢ Hyaluronate ➢ Chondroitine
Bactérienne	➢ Curdlane ➢ Gellane ➢ Pullulane ➢ Xanthane
Végétale	➢ Amidon ➢ Pectine ➢ Oligosaccharides ➢ Cellulose…etc
Algale	➢ Agar ➢ Carraghénane ➢ Ulvane ➢ Alginates

Les substances pectiques

Définition

Les pectines sont une classe de polysaccharides hétérogènes trouvés dans les parois cellulaires de la plante. La pectine commerciale est extraite de citrus, de pomme, ou d'autres plantes supérieures. Elles utilisées en tant que stabilisant épaississant agent gélifiant émulsifiant, et comme véhicule de médicaments dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Les structures des pectines varient grandement en raison de ses diverses sources et méthodes d'extraction, mais elles peuvent être classés en trois catégories en fonction de caractéristiques communes à savoir homogalacturonane, rhamnogalacturonane- I et galacturonanes substitués [14].

Origine et structure chimique

Les substances pectiques sont présentes dans tous les végétaux, localisées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules où elles jouent le rôle de ciment intercellulaire, responsables de la rigidité et de la cohésion. En 1825, c'est le Français J. Braconnot qui l'isola pour la première fois et la baptisa Pectine du mot grec Pektos (ferme/rigide). Elles sont associées à d'autres composants chimiques membranaires tels que cellulose, hémicellulose, lignine, par des liaisons physiques et/ou chimiques [15]. Selon l'âge des tissus, on rencontre la pectine sous deux formes [16, 17] :

- ✓ La protopectine : insoluble car liée aux autres composants.
- ✓ L'acide pectique : soluble dans l'eau à froid.

La molécule de pectine se présente sous la forme d'un polymère linéaire d'acides D-galacturoniques joints en α (1-4) par une liaison glycosidique (Figure I.3.). Le long de la chaîne principale, est présente toute une série de substitutions qui en font rarement une structure homogalacturonique simple. Les fonctions acides carboxyliques sont plus ou moins estérifiées par du méthanol [18].

On définit ainsi le Degré de Méthoxylation (DM) des pectines comme étant le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale. De la même manière, sont liées aux fonctions hydroxyles C2 ou C3, des groupes acétyles. Ces derniers sont surtout présents dans certaines matières premières telles que le tournesol ou la betterave.

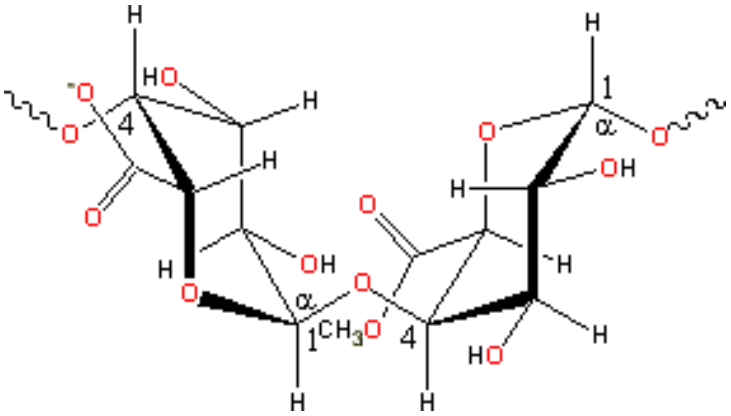


Figure I.3 : Structure de la pectine

Les pectines sont donc principalement caractérisées par leur teneur en acide galacturonique (AG), la longueur des chaînes d'acides galacturoniques (masse moléculaire) et le nombre de substituants autre qu'osidiques [19].

La pectine est un carbohydrate structural présent dans toutes les plantes, seules les céréales n'en comportent pas. Le tableau I.4 donne la teneur en substances pectiques de quelques végétaux.

Tableau II.3 : Teneur en substances pectiques de quelques végétaux

L'origine	Teneur en pectines (%)
Pomme	4.5
Carotte	10
Raifort	15
Tomate	03
Marc de pomme	15-20
Capitules de tournesol	25
Marc de betterave	15-20
Albédo des agrumes	30-35

Types de pectines

Selon leur degré de méthylation, les pectines sont divisées en deux catégories [20] :

- Les pectines H.M (pectines hautement méthylées) : ce sont les pectines dont plus de 50% des groupements carboxyles sont estérifiés avec le méthanol.
- Les pectines L.M (pectines faiblement méthylées) ce sont les pectines dont moins de 50% de groupements carboxyles sont estérifiés. Ces derniers peuvent contenir des groupements amides ; dans ce cas on parle alors des L.M.A. (low methylated amidated pectins).

Le degré de méthylation ou d'estérification des pectines joue un grand rôle dans la formation de gel. Pour les H.M, les pectines forment du gel en présence de sucres neutres ; par contre les L.M forment du gel en présence du calcium. La détermination du degré de méthylation ou d'estérification se fait généralement par analyse résonnance magnétique RMN du proton. Bédouet et al. Sont parvenus à une méthode rapide de quantification des ces derniers après 5min de saponification des pectines.

Caractérisation macromoléculaire de la pectine

La pectine est un polysaccharide, composé de différentes entités structurales secondaire, qui changent avec la méthodologie d'extraction, la matière première, et d'autres facteurs environnementaux. Les caractéristiques macromoléculaires de la pectine incluent

principalement leur masse molaire et leur conformation, et ce sont des causes déterminantes des applications industrielles des pectines [21].

La masse moléculaire et par voie de conséquence le degré de polymérisation d'un polysaccharide est une caractéristique physico-chimique importante. La masse moléculaire de la pectine est nettement moins élevée que celle de la cellulose ou de l'amidon. Les mesures des masses molaires sont difficiles en raison de l'hétérogénéité, l'insolubilité dans l'eau, et l'agrégation de la pectine ; le caractère polyélectrolyte de la pectine doit également être pris en considération. Les valeurs de masses molaires, qui s'étendent de quelques dizaines à plusieurs centaines de kilodaltons (kDa), dépendent non seulement de la méthode employée mais également de l'origine de la pectine et des moyens de l'extraction.

Basé sur la viscosimétrie, la masse molaire moyenne de la pectine commerciale varie entre 50,000 et 150,000 daltons [22]. Owens et al (1946) ont établi la première équation de Mark-Houwink-Sakurada pour des pectines dans le NaCl 0,155 M ($[\eta]=1.4\times10^{-6}M_{\eta}^{1.34}$, où [η] est la viscosité intrinsèque en dLg^{-1}, et M_{η} est la masse moléculaire moyenne de viscosité).

Extraction des pectines

La pectine contenue dans les fruits a de tout temps été utilisée, in situ, par la ménagère, pour la gélification des confitures. Ce n'est qu'au début du XXe siècle que la pectine a fait l'objet d'une extraction industrielle, dans le but de compenser dans un premier temps la faible teneur en pectine de certains fruits [23].

Aujourd'hui la pectine est très largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique pour ses propriétés gélifiantes, stabilisantes ou viscosifiantes.

Dans la paroi végétale, les pectines existent sous des formes liées (en association avec d'autres polymères pariétaux) et sous formes libres. Les pectines libres (ou pectines solubles) proviennent généralement des activités endogènes des enzymes et des agents chimiques de la paroi sur les pectines liées. Une action physique peut aussi provoquer la libération et la solubilisation des pectines initialement liées. Les pectines peuvent par conséquent être extraites des parois végétales par trois différentes méthodes : Chimique, Enzymatique et Physique [20].

L'extraction industrielle de la pectine se fait à partir des sous-produits de l'industrie des jus de fruits. Marcs de pommes et écorces d'agrumes sont les sources principales et abondantes de pectine en raison de leur richesse en protopectine et en acide pectique. La pectine de pomme est plus riche en sucres neutres et en amidon (qui constitue le « ballast ») mais moins riche en protéines et calcium que la pectine d'agrumes. Le procédé d'extraction est basé sur l'hydrolyse

en milieu acide et chaud de la protopectine qui se transforme en acide pectinique. Le jus obtenu est traité par de l'isopropanol, afin de précipiter la pectine. Le coagulum, à l'aspect fibreux, est lavé, pressé, séché sous vide, puis broyé pour obtenir une poudre fine [16]. Les réglages de la température, du pH et du temps de l'hydrolyse permettent de prédéterminer le DM de la pectine. Les pectines ainsi extraites, ont le plus souvent un DM compris entre 55 et 75 % (pectines HM). Leur masse moléculaire est généralement élevée. Les pectines LM sont obtenues par désestérification chimique, acide et/ou alcaline des pectines HM [23]. Les différentes étapes de la fabrication des pectines sont représentées sur la figure I.4.

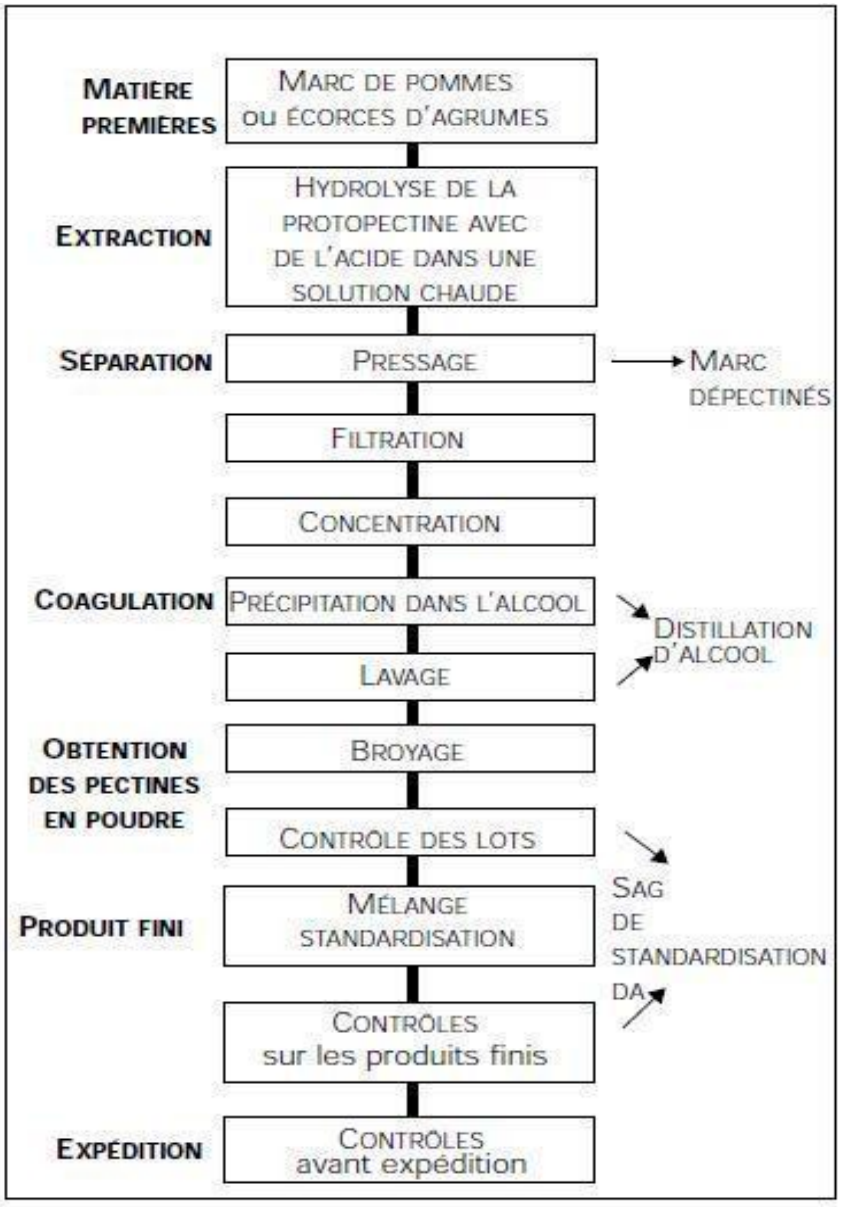


Figure I.4 : Déférentes étapes de production industrièlle de péctine

Propriétés des pectines

A. Solubilité des pectines

Les pectines se comportent comme des polyélectrolytes grâce à la présence des groupements carboxyliques dans leur squelette. La solubilité est déterminée par le pKa qui varie dans une gamme de valeurs constantes (2,9 - 3,2). La solubilité des pectines dépend de divers paramètres dont entre autres :

- ✓ Le solvant, sa nature et sa force ionique.
- ✓ La nature de la pectine et sa concentration.
- ✓ Le pH de la solution.
- ✓ La température de la solution.
- ✓ Les contre- ions d'autres polymères existants dans la solution.
- ✓ Le degré de polymérisation.
- ✓ L'ionisation des groupements carboxyles et leur distribution.

Tout solvant susceptible de favoriser la dissociation se présente comme un bon agent de solubilisation des pectines. En général les pectines sont solubles en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le dimethyl-formamide, et le glycérol .

B. Stabilité des pectines

La stabilité maximale des pectines a lieu à pH 4. Pour des pH < 3 et à basse température, les groupements acétyles et méthyles sont déstabilisés et les sucres neutres sont hydroxylés. Si la température est élevée l'hydrolyse est accélérée. En milieu alcalin et à basse température les groupements esters sont saponifiés. En milieu neutre et à température ambiante la saponification est accompagnée de la réaction de dépolymérisation, cette dégradation à lieu uniquement dans les liaisons glycosides et dans les résidus méthylés de1'acide galacturonique. A des températures supérieures à 60° C, cette dégradation à lieu qu'à pH légèrement acide (pH proche de 5).

C. Propriétés gélifiantes

Un gel est un réseau tridimensionnel de macromolécules incluant un solvant. Celui-ci est provoqué par des changements physiques ou chimiques qui tendent à diminuer la solubilité de la pectine, favorisant la formation de cristallisations locales [23]. La gélification consiste en l'association des chaînes de polygalacturonate, par formation des zones de jonctions [24].

Les gels de pectines sont des gels physiques formés par association locale entre les chaînes macromoléculaires au niveau des zones de jonctions. La nature exacte de la zone de jonction dépend de la structure chimique des pectines et doit être d'une longueur minimale pour être stable compte tenu des caractéristiques du milieu auxquels s'ajoutent les facteurs intrinsèques (masse moléculaire, charge, degré de substitution, teneur en acides galacturonique) et extrinsèques (température, pH, force ionique, nature des ions dans le milieu).

Selon que l'on s'attache aux pectines HM ou LM, différenciées par leur DM (ou DE), le mécanisme de gélification ainsi que les propriétés du gel sont différents. Le gel de pectine HM est un gel sucré et acide alors que le gel de pectine LM est principalement calcique, thermoréversible et thixotrope.

D. Propriétés viscosifiantes

Cette propriété est obtenue quand les molécules modifient le comportement de la phase continue du fait de leur structure (PM/encombrement/…) sans pouvoir créer de zones de jonctions. Les pectines HM de haut poids moléculaire dans les milieux non propices à la gélification (ex : boisson fruitée) présentent cette propriété. En ce qui concerne les pectines LM, on parlera plutôt de comportement typiquement viscoélastique, dont chacune des composantes peut être modifiée en fonction, par exemple, de la teneur en calcium du milieu réactionnel [19].

Domaines d'applications des substances pectiques

La pectine est largement utilisée entant qu'agent gélifiant, épaississant, et stabilisant dans l'industrie alimentaire principalement pour les produits à base de fruits.

A. Industrie alimentaire

La pectine a la propriété de former un gel avec du sucre. Pour cette raison, la pectine est employée, en combinaison avec le sucre, comme agent d'épaississement ; dans l'industrie alimentaire. Les différentes utilisations des pectines en industrie alimentaire peuvent être résumées comme suit :

- Préparation des confitures et des gelées ; la pectine est ajoutée aux confitures pour compenser les variations de la teneur en pectine de fruits. La pectine est incorporée dans la confiture pour améliore sa consistance.
- Confiture pour yaourt et produits laitiers divers.
- En confiserie dans les pâtes à fruits et confiseries gélifiées.

- Produits pour fourrage et décor (biscuiterie et pâtisserie) ; la pectine a pour rôle de limiter les migrations possibles de l'humidité d'une couche à une autre.
- Produits pauvres en matière sucrée (laits gélifiés, sauces de nappage ou de décors aux fruits pour crèmes glacés…).

Les pectines sont également employées comme stabilisateurs dans l'industrie laitière, où la fonction principale est d'agir en tant qu'hydrocolloïde protecteur. La stabilisation de la protéine dans les boissons (pH = 4) est un domaine d'application de plus en plus important pour la pectine HM.

B. Industrie pharmaceutique

Dans le sang, les pectines ont une action immunologique par l'activité de formation des anticorps et une action détoxifiante sur les métaux lourds (plomb). Elles ont par ailleurs, une action antidiahétique et antivomitive. Les pectines protègent les vaisseaux sanguins contre l'athéroxlérose par la diminution d'absorption intestinale des lipides et du cholestérol.

Dans des applications pharmaceutiques modernes, la pectine a beaucoup d'intérêt comme excipient pour des systèmes de la libération des médicaments. La libération du médicament du côlon peut être réalisée avec des formes galéniques contenant la pectine, seul ou en combinaison avec d'autres polymères. Le profil de libération du médicament peut être changé en fonction du degré d'estérification. La pectine a des propriétés bioadhésives, qui peuvent être exploitées pour la libération nasale. De plus, la pectine est une fibre alimentaire soluble qui diminuerait les risques de cancer du côlon.

La pectine peut être formulée en solution, gel, ou un film et être employée en sirops, suspensions, pastilles, pâtes, comprimés et capsule.

C. Industrie cosmétique

Les propriétés de la pectine sont utilisées dans une variété d'applications personnelle de soin, y compris des produits de peau et de cheveux. Les gels de pectine peuvent être employés pour préparer des pâtes sans utilisation des agents tensioactifs.

Dans l'industrie cosmétique, la pectine est utilisée dans la fabrication des vernis, des huiles et des crèmes. Elle est aussi utilisée comme un agent épaississant et stabilisant dans les gels pour les cheveux, les lotions et le shampooing.

Les huiles essentielles

Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et sa santé.

Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques [25].

Les hydrolats (eaux aromatiques) étaient utilisés en Inde il y a plus de 7000 ans. Les plantes aromatiques figurent dans un traité publié en chine par Shen Nung il y a environ 4500 ans. Entre 3000 et 2000 ans avant notre ère, les Egyptiens faisaient un usage important des plantes aromatique et aussi des plantes pour soigner les malades.

Les premiers à utiliser l'hydrodistillation semblent être les perses, 1000 ans avant notre ère. L'utilisation des huiles essentielles était pratique courante chez les grecs et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet.

Les Arabes ont apporté une amélioration significative dans la chimie et dans la distillation des huiles [20].

L'aromathérapie tomba ensuite dans l'oubli, toutefois il a fallu attendre le XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928 René-Maurice Gatte Fossé chimiste Français publia un ouvrage « aromathérapie » décrivant la relation entre la structure biochimique des huiles essentielles et son activité antimicrobienne.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entrainé un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des H.Es dans différents domaines [25].

Définition

Les huiles essentielles (H.Es) sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire.

Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie qui est Paromathérapie [26].

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les Huiles essentielles sont constituées de différents composants comme les terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments [26].

Les H.Es doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tende à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) des lipides et, à l'inverse des glycérides dans l'alcool [26].

Mais à ces caractères de solubilité se limite la ressemblance avec les huiles grasses. Si les HE forment une tache transparente sur le papier, celle-ci disparaît rapidement car les essences végétales sont très volatiles (contrairement aux résines qui, habituellement dissoutes dans les essences, laissent un résidu visqueux ou solide après évaporation des essences).

Répartition systématique et lieu de synthèse

Les H.Es n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent, en particulier les labiés (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les Ombellifères (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), les Lauracées (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) [26].

Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre), sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graines (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe [2].

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de celle-ci peut varier selon sa localisation [20].

La synthèse et l'accumulation des H.Es sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *Labiaceae, Geraniaceae,* et *Rutaceae,* ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae, Auranthiaceae*, ainsi que les canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaceae Apiaceae* ou *Asteraceae* [25].

Quantitativement, les teneurs en H.Es sont extrêmement faibles. Pour produire 200g d'essence de Thym, il faut 100kg de plantes fraîches, et à titre d'exemple selon PADRINI & LUCHRONI, (2003), pour obtenir 1kg d'H.E il faut [25] :

- 1 tonne de fleur d'oranger.
- 4 tonnes de pétales de Rose.
- 6 à 7 kg de boutons floraux de clous de Girofle.
- 100 kg de sommités fleuries de Lavande.
- 7 tonnes de Mélisse.
- 1 tonne de Verveine.

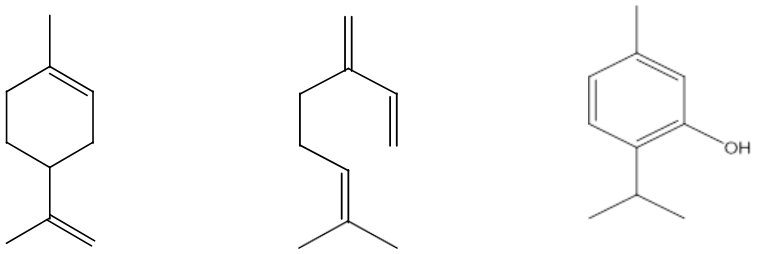
Composition chimique

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir [27]. Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils [28]. Les terpènes sont constitués de : monoterpènes (myrcène, β-pinène, γ-terpinène) et les sesquiterpènes (β-caryophyllène, α- humulène, β-bisabolène etc.) [29].

Les terpènes

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés (C5)n ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène), on distingue la classification suivante [30]:

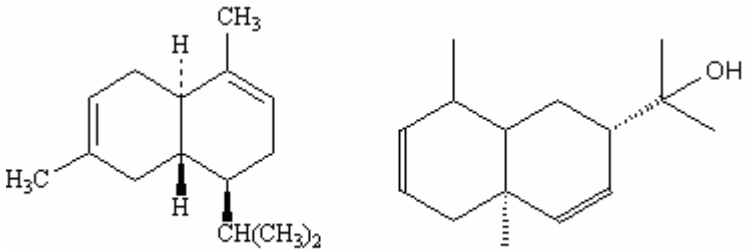
- ✓ Pour **n = 2** : **les monoterpènes**. Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en C10. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (Figure I.5). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.



Limonène (Citron et orange) | Myrecène (Feuille de laurier) | Thymol (Thym)

Figure I.5 : Exemple des composants monoterpéniques

- ✓ Pour **n = 3** : **les sesquiterpènes**. Ce sont des hydrocarbures de formule C15, soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes (en C10H16). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire). La figure I.6 donne des exemples des composés sesquiterpéniques.



Cadinene Eudesmol

Figure I.6 : Exemple des composants sesquiterpéniques.

- ✓ Pour **n = 4**: **les diterpènes** qui sont des dérivés d'hydrocarbures en C20. Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines. L'acide abiètique représente un exemple des composants diterpéniques (Figure I.7).

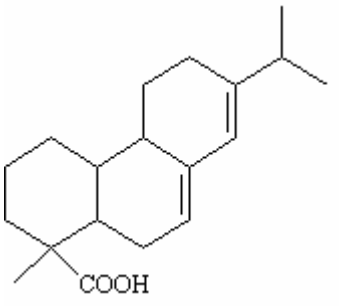


Figure I.7 : Exemple des composants diterpéniques

- ✓ Pour **n = 5** : les sesterpènes. Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C25.
- ✓ Pour **n = 6** : les triterpènes. Ces composés en C30 sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.
- ✓ Pour **n = 8** et les polyterpènes le caoutchouc naturel est l'exemple plus nomme. Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa.

Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoides. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les H.Es d'*Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic) [25].

Les composés d'origine diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et α-linolénique en (3-cis hexanol, decanal, β-ionone) [25].

Facteurs influençant la composition chimique

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E: la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les citrus ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée. Les fleurs de

Chrysanthemum caronarum sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants [28, 25].

Propriétés physiques des huiles essentielles

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physique communes. Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (Anthemis nobilis) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chama.zulène [31].

Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de sassafras. La densité nous renseigne selon Garnero (1996) sur la composition chimique : ainsi une densité inférieure à 0.9 indique la présence, dans cette huile, de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1 indique une composition très variée en composés terpéniques polycycliques.

Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Les huiles essentielles s'évaporent et se volatilisent à température ambiante. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques.

Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires par exemple les points d'ébullition du caryophyllène, du géraniol, du citral et du α-pinène sont 260°C, 230°C, 228°C et 156°C respectivement [32], mais d'après Valnet (1984), ce point varie de 160°C à 240°C.

Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent pas. Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeurs se modifient, leurs points d'ébullition augmentent et leurs solubilités diminuent. Elles absorbent le chlore, le brome et l'iode en dégageant de la chaleur [33].

Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau [31].

Propriétés physiologiques

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles (H.Es) entraîne des activités physiologiques variées [20]:

- Certaines H.Es agissent au niveau du tube digestif: ce sont des stomachiques, eupeptiques, carminatifs (ex: essences de Badiane, Menthe, Verveine); d'autres sont cholagogues ou cholérétiques (Sauge); d'autres encore sont vermifuges (Tanaisie, Chénopode).
- Certaines ont des propriétés antiseptiques au niveau respiratoire (H.Es de Pin, d'Eucalyptus, de Niaouli) et au niveau de voies urinaires (H.Es de Buchu).
- Quelques-unes ont des propriétés stimulantes du système nerveux central ; l'exemple le plus important est celui des plantes à anéthol.
- D'autres, sont actives, en usage externe, comme anti-inflammatoire, cicatrisant (Lavande, Romarin, Sauge…).

Toxicité des huiles essentielles

Les H.Es sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives.

L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine [34].

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle…etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande…etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL50 comprise entre 1 et 2 g /kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg) [28].

Champs d'applications des huiles essentielles

Les plantes aromatiques donnent les huiles essentielles, essences destinées à l'utilisation industrielle. Ces H.Es ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits : elles sont destinées en effet à quatre grands secteurs industriels [35].

Secteur parfumerie/ cosmétique

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. L'Europe et les Etats-Unis ont développé des industries importantes qui démarquent par leur haut niveau d'exportation dans ce domaine. La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés.

Secteur parfumerie technique

La parfumerie technique (qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels) a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au meilleur prix possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum.

Secteur alimentation

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le gout des aliments, pour parfumer et colorer. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'huiles. Aussi, les fabricants d'aliments préparés les utilisent de plus en plus parce que le nombre de produits augmente et le consommateur recherche d'avantage les produits avec des ingrédients naturels. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange.

Secteur médecine

Dans le domaine de la santé, il faut distinguer le secteur pharmaceutique de celui des médecines douces. Dans ce deuxième secteur, les vertus thérapeutiques des huiles sont reconnues et utilisées depuis des siècles dans beaucoup de pays. En effet, ce marché a donné naissance à une industrie des produits naturels comme les produits homéopathiques. Cette

industrie, très développée en Europe, bénéficie d'un attrait croissant de la part des consommateurs non seulement en Europe mais aussi en Amérique du Nord. De plus, les produits naturels avec effets thérapeutiques ont attiré l'attention des divers groupes pharmaceutiques.

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues pures en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons… ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge [35]. Par conséquent, les huiles essentielles ont une variété d'applications et, dans bien des cas, la même huile peut être recherchée pour des propriétés différentes selon les secteurs industriels. Les propriétés médicinales des HE sont nombreuses, mais chacune possède ses vertus particulières [36].

Procédés d'extraction des huiles essentielles

De tous temps, on connait les vertus des « essences de plante » et on s'efforça de les extraire depuis la plus haute antiquité. C'est vers le 13ème siècle, en Europe, plus précisément dans le Sud de la France, au royaume des parfums, que l'on a commencé à explorer diverses méthodes d'extraction de ces huiles volatiles [37]. Connaissant mieux les constituants des huiles, des techniques se sont développées visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant.

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées. La distillation est de loin, le procédé le plus utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

La distillation

La distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation). La distillation peut s'effectuer avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage.

La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau.

Le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal [38] : Hydrodistillation et entrainement à la vapeur d'eau.

A. Hydrodistillation

Distillation à l'eau ou « hydrodistillation » : le matériel végétal est en contact direct avec l'eau (Figure I.8). Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont :

- La calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle [32].
- La non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux)
- La modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation [39].

Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. Parmi les huiles extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron [40].

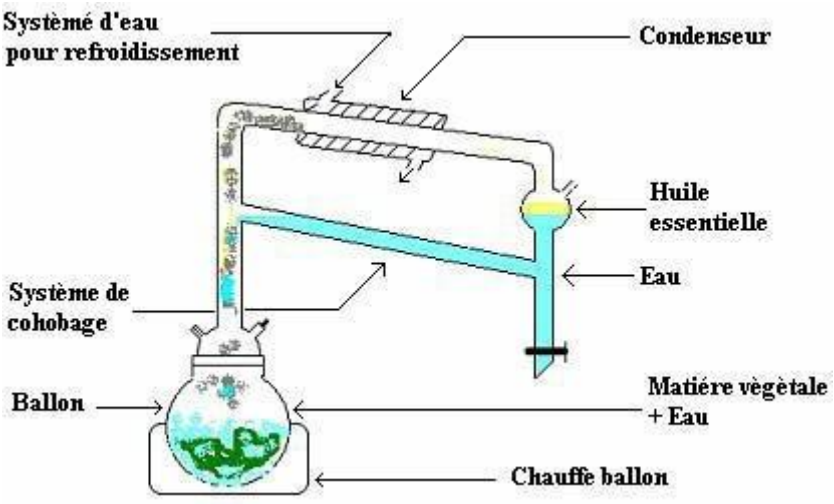


Figure I.8 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile

B. Distillation à la vapeur

Distillation à la vapeur saturée : «vapo-hydrodistillation» : c'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques [41]. Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau (Figure I.9). Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat [38].

Cette méthode est utilisée dans la distillation à partir de plantes fraîches telles que la menthe et le myrte et les plantes qui portent leurs huiles essentielles dans les feuilles qui sont cueillies puis partiellement coupées ensuite portées au dispositif de distillation. Puisque la plante fraîche est riche en eau, donc il n'est pas nécessaire de l'immerger [40].

Distillation à la vapeur directe : c'est une variante de l'entraînement à la vapeur qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur, la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion [38]. Il découle des recherches de Fathy et al. (1965), Rudolf (1968), de Vernon et Richard (1976) que l'entraînement à la vapeur d'eau est préférable

à l'hydrodistillation du fait qu'elle permet une extraction totale des huiles essentielles en améliorant le rendement de 33% par rapport à l'hydrodistillation.

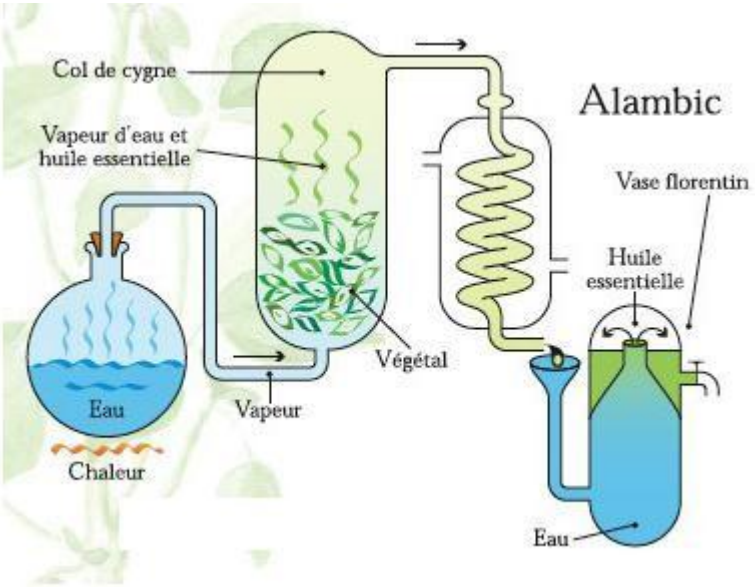


Figure I.9 : Appareillage utilisé pour l'entrainement à la vapeur d'eau

Extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales frais jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide [37, 42]. Pour certaines plantes, on procède à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou « digestion » [28]. Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs aromes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys [37]. Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite [43].

Extraction par les solvants volatils

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé « concrète ». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolue » [33, 42] Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants), stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts, sécurité de manipulation c'est à dire non toxique ou inflammable. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol. Après l'extraction, le solvant est distillé et en fin de l'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci [28].

L'extraction par les solvants présente toutefois des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits : de nombreuses substances peuvent de ce fait se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, certaines coumarines) et imposer une purification ultérieure, et en second lieu, à la toxicité des solvants et leur présence sous forme de traces résiduelles dans l'extrait final [28]. En effet, Viaud (1993) affirme que des analyses sérieuses, par les méthodes les plus modernes, montrent que les proportions de solvants résiduaires dans les concrètes se situent entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles huiles ne sont donc pas admissibles à l'usage médical par contre, elles sont admissibles en parfumerie.

Extraction par expression

L'essence, altérable par entraînement à la vapeur d'eau, est ici extraite du péricarpe frais d'agrumes par différents modes d'extractions : dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle [28] ; ou encore après scarifications mécaniques, un entraînement de l'huile essentielle par un courant

d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment [44]. Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part [42].

Extraction au fluide supercritique

Procédé relativement nouveau semblait à priori intéressant pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. En effet, dans des conditions particulières de température et de pression situées au-delà du point critique, les fluides à l'état supercritique acquièrent des propriétés importantes qui se caractérisent par une bonne diffusibilité dans les matières solides et un bon pouvoir solvant. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, mais l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO_2 car, celui-ci présente d'incontestables atouts : produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu couteux [28, 45].

L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et le charge en composé à extraire ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait (Figure I.10). L'extraction des huiles essentielles par le CO_2 supercritique fournit selon Scheffer (1996) des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques. Bruneton (1999) précise aussi que cette méthode est utilisée maintenant pour préparer des extraits d'épices (gingembre, paprika, céleri), des arômes (thé noir, bois de chêne fumé) et des essences végétales pures (débarrassées des terpènes, dépourvues d'intérêts olfactifs et oxydables, ou privées de certains constituants) et que les produits obtenus par cette technique ont une composition proche de celle des produits naturels et ne comportent aucune trace résidentielle de solvant, contrairement à ce que l'on peut obtenir avec des solvants ordinaires.

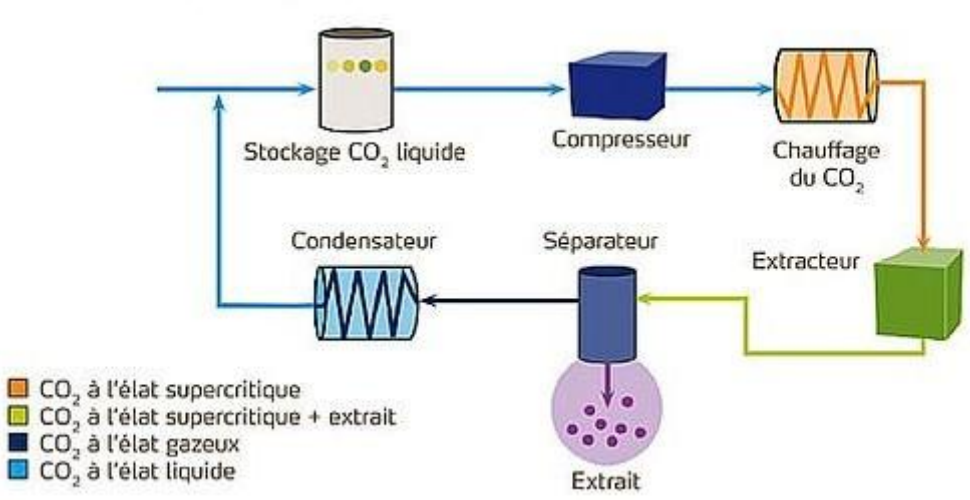


Figure I.10: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique

En conclusion, et selon Collin (2000), il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque végétal, chaque partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commandent la technologie à employer. Bien entendu, les aspects de rentabilité économique sont tout aussi importants.

Introduction

La partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires de chimie et de biologie de la faculté des sciences de l'université de Médéa. Cette étude expérimentale consiste en une valorisation des graines de citrouille pour l'extraction des substances pectiques et des huiles essentielles. Donc notre partie expérimentale comporte :

1- Extraction des substances pectiques par voie acide à chaud.

2- Caractérisation physicochimique des pectines extraites.

3- Extraction des huiles essentielles à partir des graines de citrouille par hydrodistillation.

4- Caractérisations physicochimiques des huiles extraites et des hydrolats aqueux.

Dans ce chapitre, nous présentons les différents produits et matériels utilisés et nous donnons un rappel bibliographique sur les principes fondamentaux des différentes méthodes d'extraction et de caractérisation utilisées dans ce travail.

Produits et matériels

Les différents produits ainsi les matériels utilisés lors de cette étude expérimentale, sont rassemblés dans le Tableau II.1.

Matériels	Produits
pH mètre	Acide chlorhydrique
Balance	Acide sulfurique
Bain marie	Éthanol
Etuve	Rouge de phénol
Agitateur	Chlorure de sodium
Spectrophotomètre UV-visible	Hydroxyde de sodium

Préparation du matériel végétal

La matière végétale utilisée dans cette étude est les graines de citrouille. Ces derniers sont de taille moyenne avec une couleur blanche (Figure II.1)

Les graines ont été achetées du marché de la wilaya d'Alger.



Figure II.1 : Graines de citrouilles

Avant d'être utilisées, les graines ont subi un broyage à l'aide d'une moulinette électrique en poudres (Figure II.2). Les poudres des graines ainsi obtenues ont été stockées dans des flacons à température ambiante jusqu'à leur utilisation.



Figure II.2 : Poudres des graines de citrouilles

Extraction des substances pectiques

Protocole expérimental

La pectine a été extraite par voie acide à chaud selon la méthode décrite par Azad et al., (2010) [46]. La poudre des graines de citrouilles a été homogénéisée dans une solution acide aqueuse avec un rapport solide/ liquide : 1/5. Le pH est ajusté à 1.67 en utilisant une solution d'acide fort (H_2SO_4 ou HCl 1M). Le mélange a été placé dans un bain marie maintenue à une température particulière (60, 80,100 ° C) pendant une durée bien déterminée (60, 90, 120 minutes).

A la sortie de bain-marie, un refroidissement rapide a été effectué suivi d'une filtration à travers la gaze puis à l'aide d'un papier filtre. Le jus pectique ainsi obtenu est prêt à la précipitation.

La pectine a été précipitée en ajoutant deux volumes d'éthanol (96%) à un volume de la solution de pectine (rapport volumique pectine /éthanol :1/2). Après une nuit de repos, maintenue à la température ambiante, le précipité est filtré à travers un papier filtre et lavé par l'éthanol. Finalement, le produit est séché dans l'étuve à 50°C. La pectine obtenue est broyée, pesée et conservée dans des flacons bien fermés jusqu'au moment de l'analyse.

Les principales étapes impliquées dans l'extraction de la pectine sont résumées dans la figure II.3.

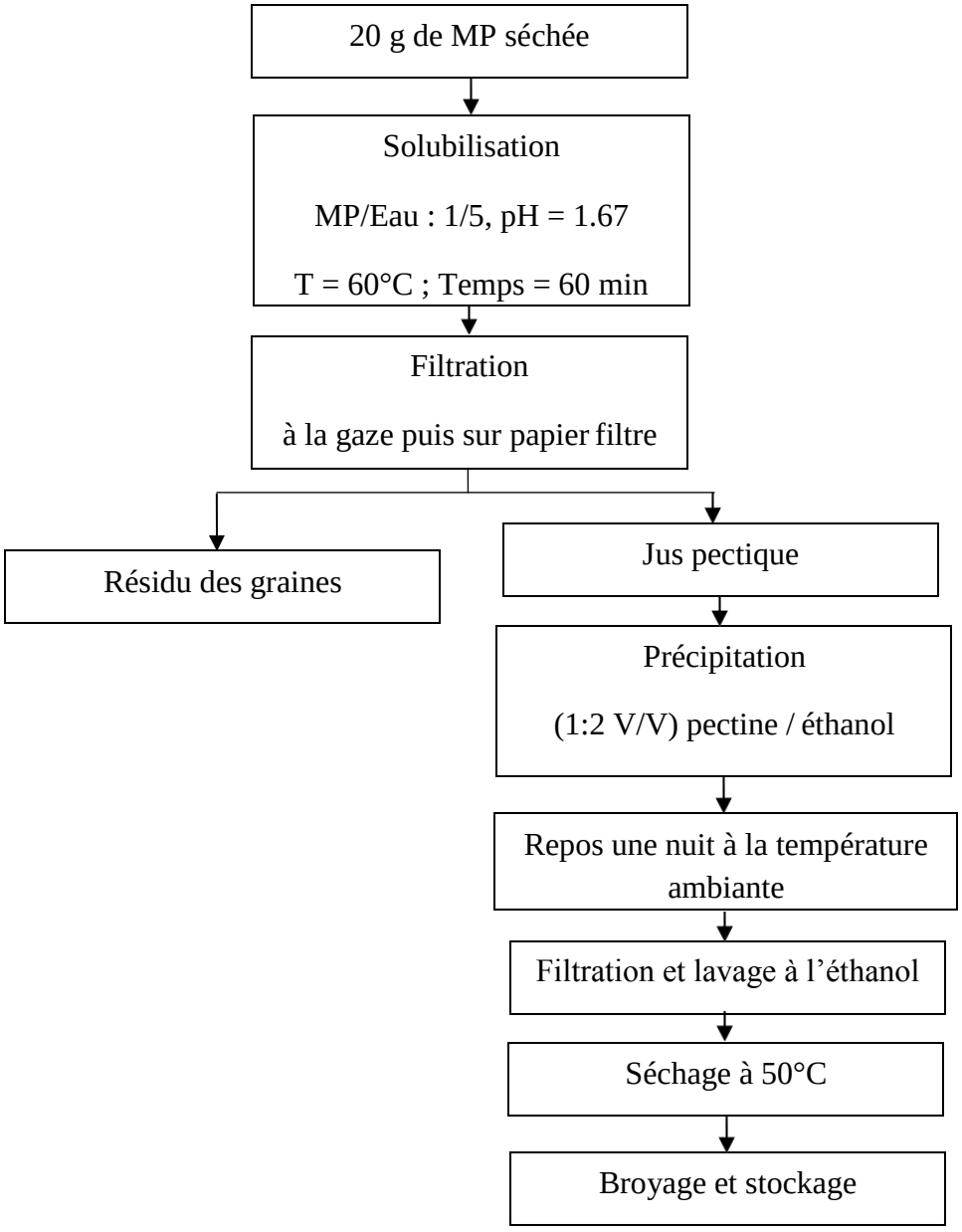


Figure II.3 : Protocole d'extraction de la pectine par voie acide

Calcul du rendement d'extraction de pectine

Les rendements en pectines sont exprimés en pourcentage et ils ont été calculés par rapport à la masse initiale traitée (masse des graines séchés) selon l'équation suivante :

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100 \qquad (\mathbf{II.1})$$

Où : m est la masse de la pectine obtenue (g), et m_0 est la masse de l'échantillon traité (g).

Analyse et caractérisation physicochimique des pectines extraites

Test organoleptique

La couleur de la pectine extraite a été identifiée par observation visuelle.

Solubilité de la pectine dans de l'eau froide et chaude

Une quantité (0,1 g) de la pectine sèche de chaque échantillon a été mesurée dans un flacon conique contenant 5 ml d'éthanol à 95% et 25 ml d'eau distillée. Le mélange a été complètement secoué pour former une suspension qui a été chauffée pendant 15 minutes [47].

Détermination du poids équivalent (PE)

Le poids équivalent a été déterminé selon la méthode de Ranganna [48]. Un échantillon de pectine (0,25 g) a été pesé dans un flacon conique de 250 ml ; suivi par l'addition de 5 ml d'éthanol, 0,5 g de chlorure de sodium et 100 ml d'eau distillée. Le mélange a été vigoureusement secoué et 3 gouttes de rouge de phénol ont été ajoutées et la solution a été titrée par du NaOH 0,1 N jusqu'à une couleur pourpre au point final. Cette solution de neutralisation a été stockée pour la détermination de la teneur en méthoxyle. La teneur en méthoxyle est donnée par la relation suivante :

$$\text{Poids équivalent} = \frac{Poids\ de\ l'échantillon\ de\ pectine \times 1000}{Volume\ de\ NaOH\ \times Normalité\ de\ NaOH} \qquad (\mathbf{II.2})$$

Détermination de la teneur en méthoxyle (MeO%)

La détermination de la teneur en méthoxyle a été réalisée en utilisant la méthode de Ranganna [48]. A la solution neutre obtenue précédemment (Détermination du EqW), 12,5 ml de NaOH 0,25N ont été ajoutés. Le mélange a été soigneusement agité et maintenu à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, 12,5 ml de HCl 0,25 ont été ajoutés et la solution a été titrée contre du NaOH 0,1N. la teneur en méthoxyle est calculée comme suit :

$$\text{Teneur en méthoxyl (\%)} = \frac{Volume\ de\ NaOH \times Normalité\ de\ NaOH \times 3.1}{Poids\ d'échantillonde\ pectine} \qquad (\mathbf{II.\ 3})$$

Détermination de la teneur en acide anhydrouronique total (AUA)

L'AUA total de la pectine a été obtenu par la méthode de Mohammed et Hassan en utilisant la formule suivante [49] :

$$\text{AUA (\%)} = \frac{176\ \times 0.1\,\text{Z}\ \times 100\ -\ 176 \times 0.1\text{Y} \times 100}{\text{Poids de l'échantillon de pectine} \times 1000} \qquad (\mathbf{II.\ 4})$$

Avec :

Une unité moléculaire d'AUA (1 unité) = 176 g

Z : Titre de NaOH (ml), obtenu à partir de la détermination du poids équivalent

Y : Titre de NaOH (ml), obtenu à partir de la détermination de la teneur en méthoxyle

Détermination du degré d'estérification (DE)

Le degré d'estérification des pectines est déterminé par la méthode titrimétrique. Un échantillon de pectine (250mg) a été transféré dans un erlenmeyer de 250 ml, humidifié avec 2 ml d'éthanol et dissous dans 100 ml d'eau distillée. Après la dissolution complète, 5 gouttes de phénophtaléine ont été ajoutées, et la solution a été titrée avec NaOH (0.5M) et le résultat est enregistré comme titre initial. Puis, 10 ml de NaOH (0.5M) a été ajoutée, et le mélange a été agité rigoureusement, et laissé reposer 15 min, ensuite 10 ml d'HCl (0.5M) a été ajoutée et le mélange a été agité jusqu'à disparition de la couleur rose. Cinq gouttes de phénophtaléine ont été ajoutées et la solution est titrée avec NaOH (0.5M) jusqu'à l'apparition d'une couleur rose clair. Ce volume de titrage est enregistré comme le titre final [50].

Le DE est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{DE (\%)} = \frac{\text{Titre final}}{\text{Titre initial} + \text{titre final}} \times 100 \qquad (\mathbf{II.\ 5})$$

Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantité de matière à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Certains groupements ou liaisons, considérés

comme marqueurs et notamment les fonctions acides carboxyliques des acides galacturoniques, peuvent révéler la présence des pectines.

Les spectres FTIR ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre FTIR type Vertex 70 (Brucker). Cet appareil permet une analyse des poudres fines des échantillons sans préparation des pastilles. L'échantillon à analyser est déposé directement sans aucun ajout sur une petite cuve puis analyser. Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scanne égale à 20.

Extraction des huiles essentielles

Dans cette partie, nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles à partir des poudres des graines de citrouilles par hydrodistillation.

Protocol expérimental

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation en utilisant le dispositif d'hydrodistillation donné sur la figure II.4.

Chaque échantillon, du matériel végétal, a fait l'objet d'une ébullition de 03 heures avec 300 ml litre l'eau distillé, le tout introduit dans un ballon de 500 ml surmonté d'une colonne reliée à un réfrigérant à son tour relié à une conduite d'eau froide pour permettre la condensation des vapeurs chargées d'huiles essentielles. Les vapeurs d'eau condensées sont récupérées dans un erlenmeyer. Dans une ampoule à décanter sous l'effet de l'inégalité de densité l'huile essentielle a été séparée de l'eau de l'hydrolat en procédant une extraction liquide-liquide par le diéthyl-éther. Le solvant est ensuite éliminé par une évaporation à la température ambiante. Les extraits obtenus sont conservés dans des tubes couverts du papier aluminium réfrigérateur à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Remarque :

Dans la suite de notre travail on a opté à caractériser l'hydrolat obtenu afin de dévoiler les propriétés physicochimiques et organoleptiques ainsi que la bioactivité de toutes éventuelles biomolécules recueillies dans cet hydrolat, étant donné que dans la mesure des conditions opératoires choisies dans cette étude, il était impossible d'aboutir à séparer les huiles essentielles de ces graines.

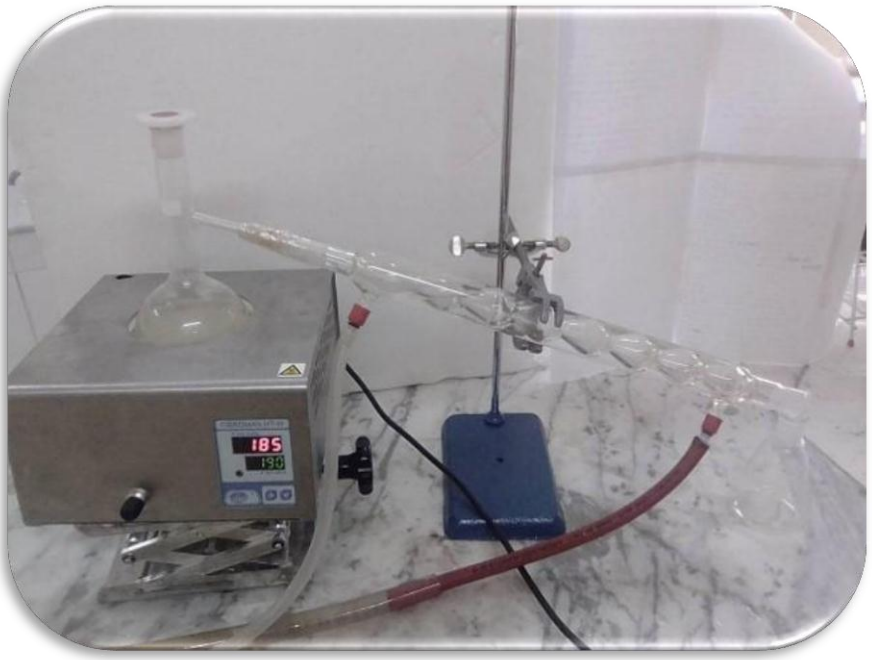


Figure II.4 : Dispositif expérimental d'hydrodistillation

Caractérisations de l'hydrolat

Densité

La densité relative qu'est une grandeur sans unité, a été définie comme étant le rapport de la masse de l'hydrolat à 20°C et la masse égale du volume d'eau distillée à 20°C. La densité relative a été déterminée à la température ambiante comme suit :

- Prendre un volume d'hydrolat et le peser ; noter sa masse ;
- Prendre un volume d'eau distillée et le peser ; noter sa masse ;

La densité relative est donnée par la formule suivante :

$$d = \frac{\rho_{hydrolat}}{\rho_{eau}} \qquad \textbf{(II. 6)}$$

Avec :

d : densité

$\rho_{hydrolat}$: masse volumique de l'hydrolat en kg/m^3

ρ_{eau} : masse volumique d'eau en kg/m^3

Indice de réfraction

L'indice de réfraction est défini par le rapport de la vitesse de transmission d'une radiation lumineuse (la raie D du sodium 589nm) dans le vide et dans un milieu transparent considéré. C'est un nombre sans dimension caractéristique d'un milieu donné.

La mesure de l'indice de réfraction a lieu sur un réfractomètre (Figure II.5). L'indice de réfraction n_D^T, à la température de référence T=20°C est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{n_D^T = n_D^{T'} + 0.0004(T' - T)} \qquad \mathbf{(II.7)}$$

Avec :

T': Température de l'expérience (25°C).

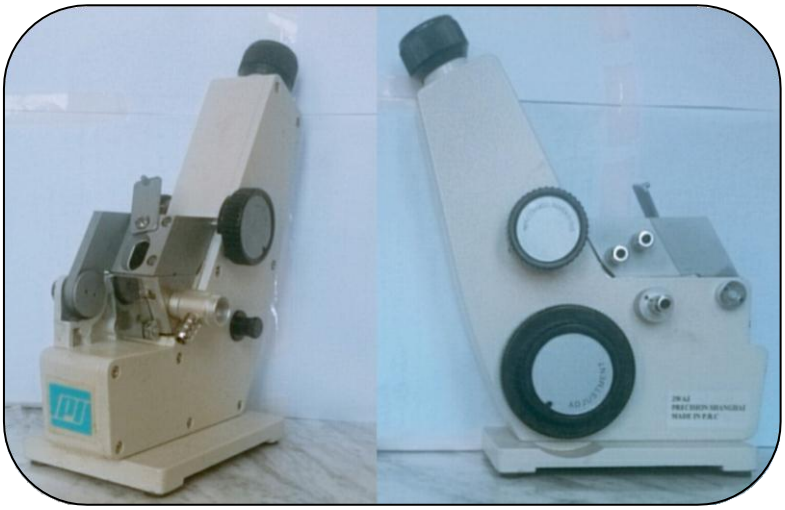


Figure II.5 : Réfractomètre

Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie

A. Principe

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de FolinCiocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMO12O4) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W8O23) et de molybdène (MO8O3) [51].

B. Mode opératoire

A un échantillon de l'hydrolat (0.2ml), une quantité de 100µl du réactif de Folin-Ciocalteu est ajoutée. Le mélange est bien agité et laissé reposer 2 à 4 min à la température ambiante. Par la suite, 0.8 ml de Na_2CO_3 (20%) est ajouté et le mélange est bien homogénéisé à l'aide d'un vortex. Le mélange est complété à 10 ml par l'eau distillée, puis incubé à la température ambiante pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Enfin une lecture à 737 nm est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Nous avons préparé dans les mêmes conditions un témoin avec de l'eau distillée à la place de la solution de l'extrait. La quantification est faite selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 600 µg/ml).

Les différentes étapes effectuées pour le dosage des polyphénols totaux des hydrolats par colorimétrie sont résumées sur la figure II.6.

C. Calcul

Les teneurs en PPT sont exprimées en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (équivalent en acide gallique) selon la formule suivante :

$$[PPT] = C \times FD \times V/m \qquad \text{(II.8)}$$

Avec :

[PPT] : la concentration des polyphénols totaux en mg EAG/g MS ;

C : la concentration obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg EAG/ml ;

FD : le facteur de dilution ;

V : le volume total du solvant d'extraction (ml);

m : la masse initial de la matière utilisé (g).

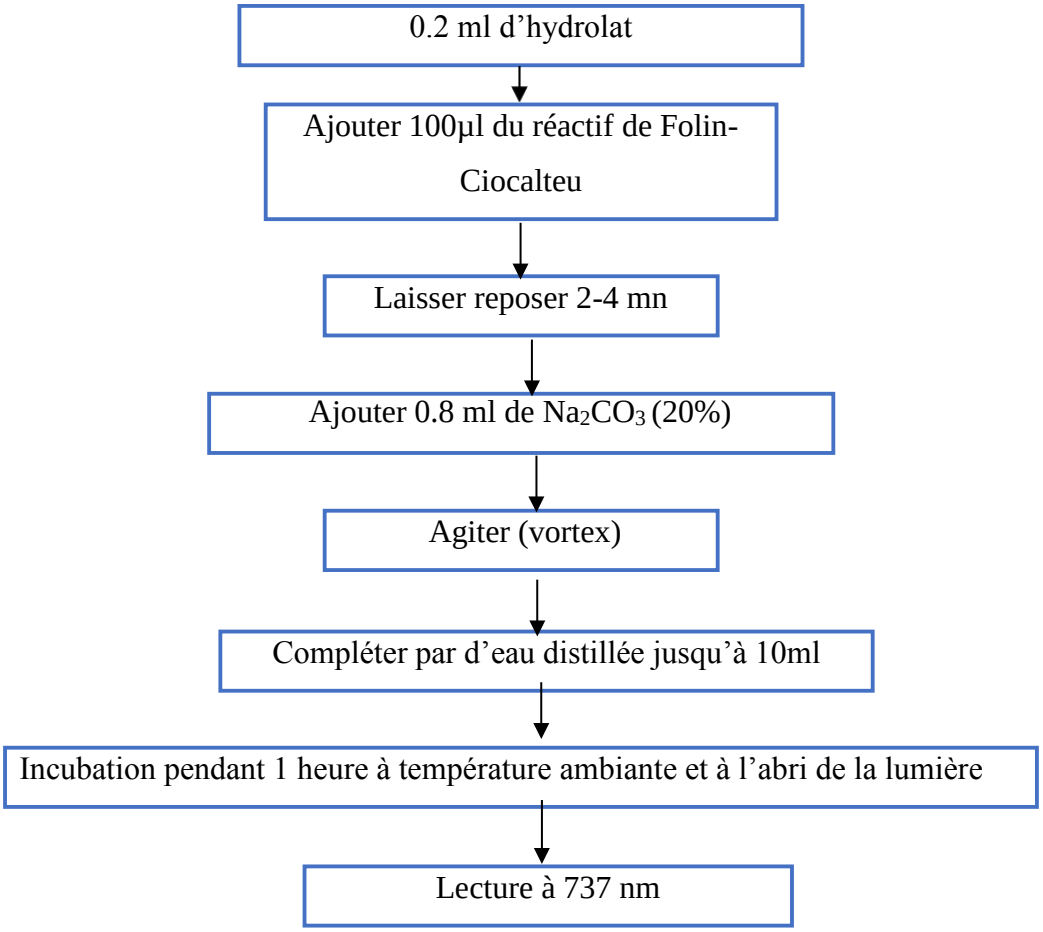


Figure II.6: Différentes étapes de dosage des polyphénols totaux

Activité antibactérienne

Afin de tester l'activité antibactérienne de notre hydrolat, nous avons fait appel à la méthode d'aromatogramme. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée par la méthode décrite par Vincent, (1991); Kavbouche et al., (2005); Ormeno et al., (2005) [52-54].

A. Principe

Le principe de l'aromatogramme est inspiré de l'antibiogramme, il consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boite de Pétri. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HE / l'extrait aqueux sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes [55].

B. Mode opératoire

Nous avons suivi la méthode préconisée par Carson et al., 1995 et Cavallo et al., 2006 [56, 57]. Cette méthode comporte les étapes suivantes :

- ✓ La gélose M-H, préalablement fondue au bain marie bouillant, a été coulée en boite de Pétri à une épaisseur de 4mm.
- ✓ Les boites de M-H refroidies sont inoculées (par inondation) de 1ml d'inoculum (10^8 UFC /ml) de façon à recourir toute la surface gélosée.
- ✓ Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imbibes d'une quantité suffisante (10µl) de chaque extrait.
- ✓ Ces disques imprègnes sont alors déposés sur la gélose et les extraits diffusent radialement des disques dans la gélose en formant un gradient de concentration.
- ✓ Les boites sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.

Note : dans notre expérience on utiliser les souches *Echerichia.coli* et *staphylococcus*

C. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres d'inhibition qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon les niveaux d'activité :

- Les bactéries montrant une sensibilité aux extraits sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible. Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne est calculé par la formule suivante [58] :

$$\textbf{\% Inhibition} = (\textbf{D}\ \text{test} / \textbf{D}\ \text{control}) \times 100 \qquad \textbf{(II.9)}$$

Dtest : diamètre de la zone d'inhibition

Dcontrol : diamètre de la boite de pétri 90mm

Dans ce chapitre nous allons présenter les principaux résultats obtenus relatifs à la caractérisation des biomolécules extraites (pectines et hydrolats) ainsi que les différentes interprétations et les conclusions que nous en avons tirées.

Caractérisation des substances pectiques

Aspect général

Les pectines extraites à partir des graines de citrouille ont une couleur vert clair. Cependant, Charity U. et al (2016) [59] ont rapporté une couleur marron pour des pectines extraites à partir des écorces de citrouille. De plus, IPPA [60] a rapporté que la pectine standard est généralement claire car les couleurs claires représentent un gel de qualité. Aina et al., [61] ont rapporté la même chose pour certaines pectines extraites à partir des écorces d'agrumes. Ils ont également suggéré que les facteurs comme la contamination de surface, le matériel agricole utilisé et l'erreur humaine peuvent avoir contribué à la variation de la couleur.

Rendement en pectines

Les figures III.1 et III.2 représentent les pourcentages du rendement en pectines extraites en milieu acide (pH = 1.76) aux différentes températures (60°C, 80°C et 100°C) et aux différents temps (60, 90, 120 min).

La fourchette du rendement en pectine pour HCl et H_2SO_4 aux différents temps et températures comprend 0.7-5.5% et 0.6-5.5% respectivement. Ces résultats nous a permis de conclure que les graines de citrouilles représentent une nouvelle source des substances pectiques.

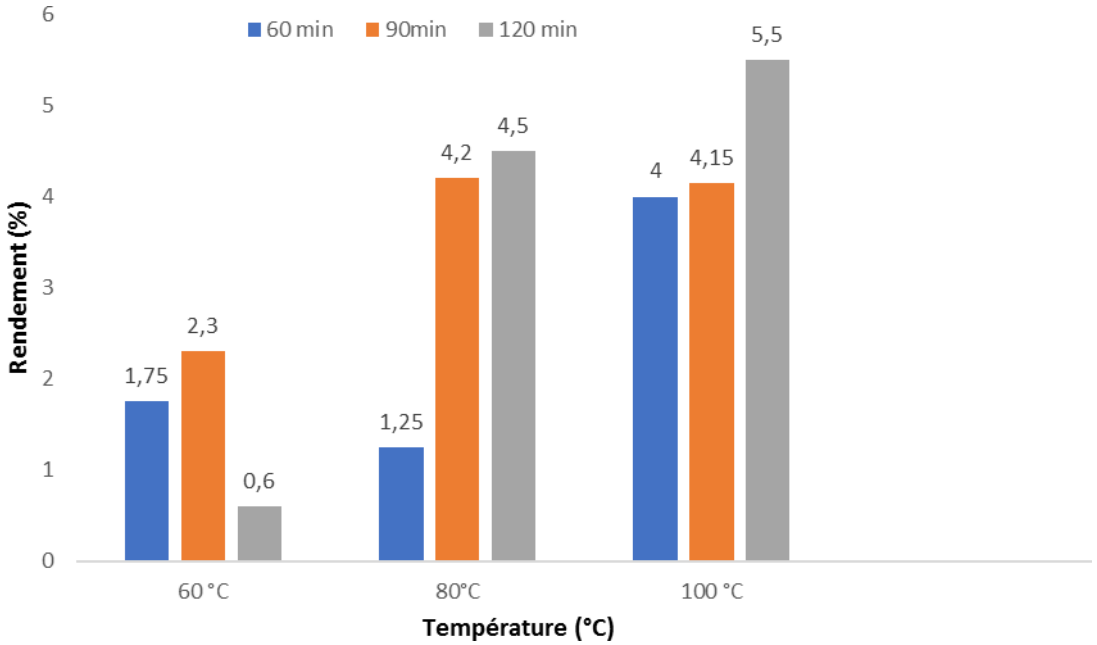


Figure III.1 : Rendement en pectines extraites par H_2SO_4

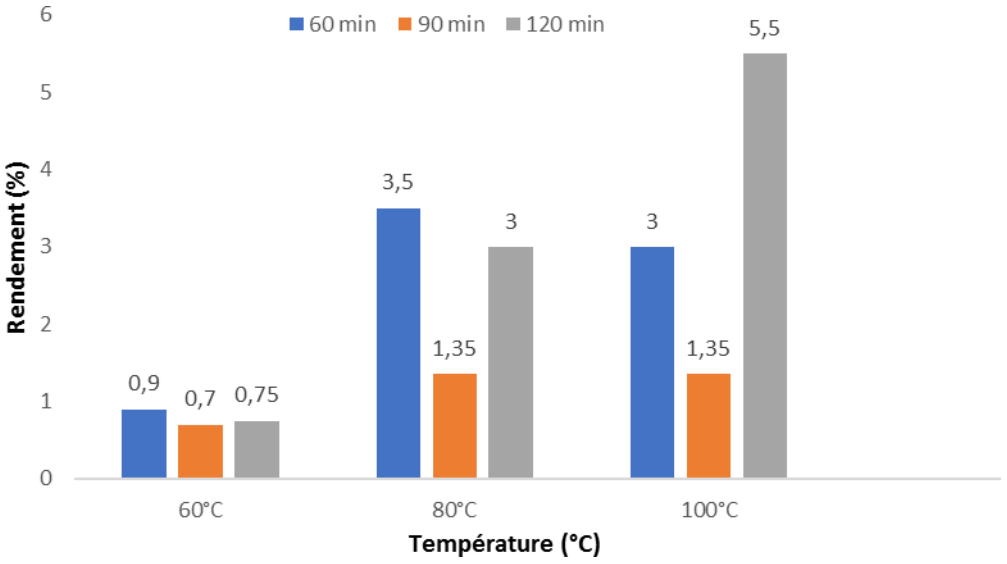


Figure III.2 : Rendement en pectines extraites par HCl

L'analyse des figures III.1 et III.2, nous a permis de tirer les points suivants :

- Le rendement en pectine dépend de la température et du temps d'extraction.
- Le meilleur rendement (5.5%) est obtenu à 100°C après 120 min d'extraction et ceci pour les deux pectines extraites par HCl et par H_2SO_4. Ces résultats sont légèrement supérieurs aux ceux rapportés par Charity U. et al (2016) [59] qui a enregistré un rendement maximal à la même température (100°C), après 90min d'extraction de l'ordre 4.5% et ceci pour des pectines extraites à partir de citrouilles.
- L'élévation de la température de 60°C à 80°C mène à une amélioration du rendement d'extraction après 90 min de 2.3% à 4.2% et de 0.7 à 1.35% et ceci pour les pectines extraites par H_2SO_4 et HCl respectivement. Alors que l'augmentation de la température de 80°C à 100°C (toujours après 90 min) n'a pas abouti à une amélioration significative du rendement en pectine avec une différence ultime enregistrée pour les pectines extraites par H_2SO_4 de l'ordre de 0.05% après 90 min d'extraction.
- Le rendement est directement proportionnel au temps d'extraction pour $H2SO4$
- En générale, les meilleurs rendements ont été enregistrés pour les pectines extraites par H_2SO_4.

Solubilité de la pectine dans l'eau

Les résultats relatifs au test de solubilité des pectines dans l'eau froide et chaude sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Test de solubilité des pectines extraites

Solubilité	**Pectine extraite par HCl**	**Pectine extraite par H_2SO_4**
Eau froide	Soluble après 24h d'agitation	Soluble après 24h d'agitation
Eau chaude (85°C)	Soluble après 10 mn d'agitation	Soluble après 10 mn d'agitation

Les résultats obtenus montrent que les pectines sont des substances hydrosolubles. La solubilité des pectines est meilleure dans l'eau chaude.

Poids équivalents

Les résultats de la détermination du poids équivalents des pectines extraites sont donnés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Poids équivalents des pectines

Pectine	Extraite par HCl	Extraite par H_2SO_4
Poids équivalent (mg/mol)	1745.08	1837

Les résultats obtenus (tableau III.2) montrent que les pectines extraites ont des poids équivalents élevés de l'ordre de 1745.08 et 1837 mg/mol pour les pectines extraites par HCl et H_2SO_4 respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés Charity U. et al (2016) [59] qui ont enregistrés des valeurs entre 1471 et 1923 mg/mol pour le même matériel végétal. Alors que, ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux rapportés par Kuman et Chauhan (1992) [62] pour le marc de pomme (833.33~1666.67) et le marc de citron (1175) comme rapporté par Azad et al., (2014) [46].

Le poids équivalent élevé obtenu dans cette étude pourrait être attribué à une faible dégradation partielle de la pectine, à la nature du processus d'extraction ou encore à la quantité d'acide libre comme le suggère Charity U. et al (2016) [59].

Ainsi, le poids équivalent des pectines est inversement proportionnel à l'acidité de ces dernières. Plus le poids équivalent augmente, plus l'acidité de la pectine est faible, c'est-à-dire le contenu de cette dernière en groupements COOH est faible.

Teneur en méthoxyle

La détermination de la teneur en méthoxyle pectines est un paramètre important dans la standardisation des pectines en pectines hautement méthylées et faiblement méthylées. Les principaux résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Teneur en méthoxyle des pectines

Pectine	Extraite par HCl	Extraite par H_2SO_4
Teneur en méthoxyle (%)	2.03	2.15

Les pourcentages de teneur en méthoxyle déterminé pour les deux pectines extraites par HCl et par H_2SO_4 sont respectivement 2,03 et 2,15 %. Des résultats similaires ont été rapportés par Charity U. et al (2016) [59] avec des teneurs de 1.48 à 2.48%. Ismail et al. (2012) ont rapportés des teneurs supérieurs allant jusqu'à 4.34% [63].

Les résultats de la teneur en méthoxyle montrent que les pectines extraites à partir des graines de citrouille sont faiblement méthylées avec des teneurs inférieurs à 7%. La teneur en

méthoxyle est un facteur important dans le contrôle de la capacité de la pectine à former des gels. La faible teneur en méthoxyle confirme la capacité de la pectine à former facilement un gel.

Teneur en acide anhydrouronique total (AUA)

Les résultats de AUA (Tableau III.4) ont montré que les pectines extraites par les deux acides ont des teneurs inférieurs à 5%, de l'ordre de 4,77% et 4,23% pour HCl et H_2SO_4 respectivement. Ces résultats sont trop faibles par rapport à ceux rapportés dans la littérature avec des teneurs supérieurs à 70% enregistrés pour les pectines de marc de pomme (74.1%) comme rapportés Kuman et Chauhan (1992) [62].

Les faibles valeurs d'AUA indiquent la faible pureté de la pectine extraite, elle pourrait contenir une grande quantité de protéines comme le suggère Charity U. et al (2016) [59].

Il faut noter que la teneur en AUA détermine la pureté de la pectine extraite et la valeur de AUA ne doit pas être <65% [64].

Tableau III.4 : Teneur en acide anhydrouronique total

Pectine	Extraite par HCl	Extraite par H_2SO_4
AUA (%)	4.77	4.23

Degré d'estérification

Le rapport des groupements acide galactouronique estérifié au groupements acide galactouronique total est appelé degré d'estérification (DE). Les résultats des mesures de DE donnés dans le tableau III.5 montrent que les pectines extraites à partir des graines de citrouille possèdent des DE inférieurs à 50%. Les degrés d'estérification enregistrés sont de l'ordre 33.33% et 50% pour HCl et H_2SO_4 respectivement. La différence observée entre les deux échantillons montre clairement que ces pectines sont extraites par différentes conditions opératoires (HCl et H_2SO_4). Par ailleurs, ces résultats confirment les résultats obtenus pour la teneur en méthoxyle.

Tableau III.5 : Degré d'estérification

Pectine	Extraite par HCl	Extraite par H_2SO_4
DE (%)	33.33	50

Le niveau de degré d'estérification rapporté dans cette étude est faible par rapport à celui trouvé par Charity U. et al (2016) [59] pour les pectines de citrouilles (55% -71%). Ceci montre bien que le DE dépend de l'espèce ou du type de matériel végétal utilisé ainsi que de la méthode et des conditions opératoires d'extraction.

Sur la base du DE, nous pouvons conclure que les pectines extraites à partir des graines de citrouilles font partie des pectines faiblement méthylées (DE<50%).

Spectroscopie FTIR

Les spectres FTIR de pectines extraites par les deux acides sont rapportés sur les figures III.3 et III.4. Les spectres FTIR des pectines extraites montrent des pics typiques correspondant à des groupements spéciaux :

- Deux bandes intenses autours de 2920 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} correspondent à l'absorption C-H, ceci inclut les vibrations CH et CH_3.
- Une bande plus forte se produisant entre 1735 et 1740 cm^{-1} correspond aux groupements carbonyles esters ($COOCH_3$).
- Une faible bande entre 1637 et 1644 cm^{-1} correspond aux ions carboxyles (COO^-).

Finalement, dans la région inférieure à 1500 cm^{-1}, les absorptions ne peuvent pas être assignées à des vibrations particulières à cause de la complexité des substances pectiques. La région spectrale entre 1450 et 760 cm^{-1} montre des pics au tour de 1450 cm^{-1} (C-H), 1367 cm^{-1} (Elongation C-C-O), 1280 cm^{-1} (C-O), et une gamme entre 1158 et 671 cm^{-1} (liaisons -glucidiques) caractéristiques des substances pectiques.

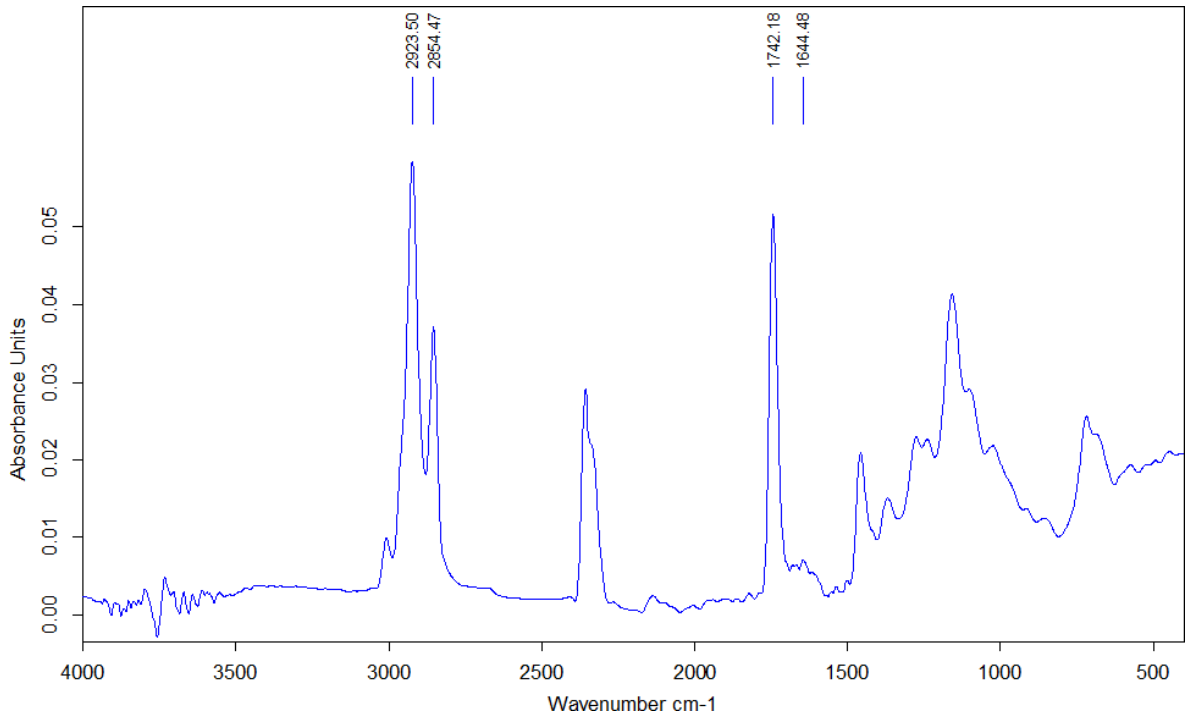


Figure III.3 : Spectre FTIR de la pectine extraite par HCl à 100°C pendant 60min

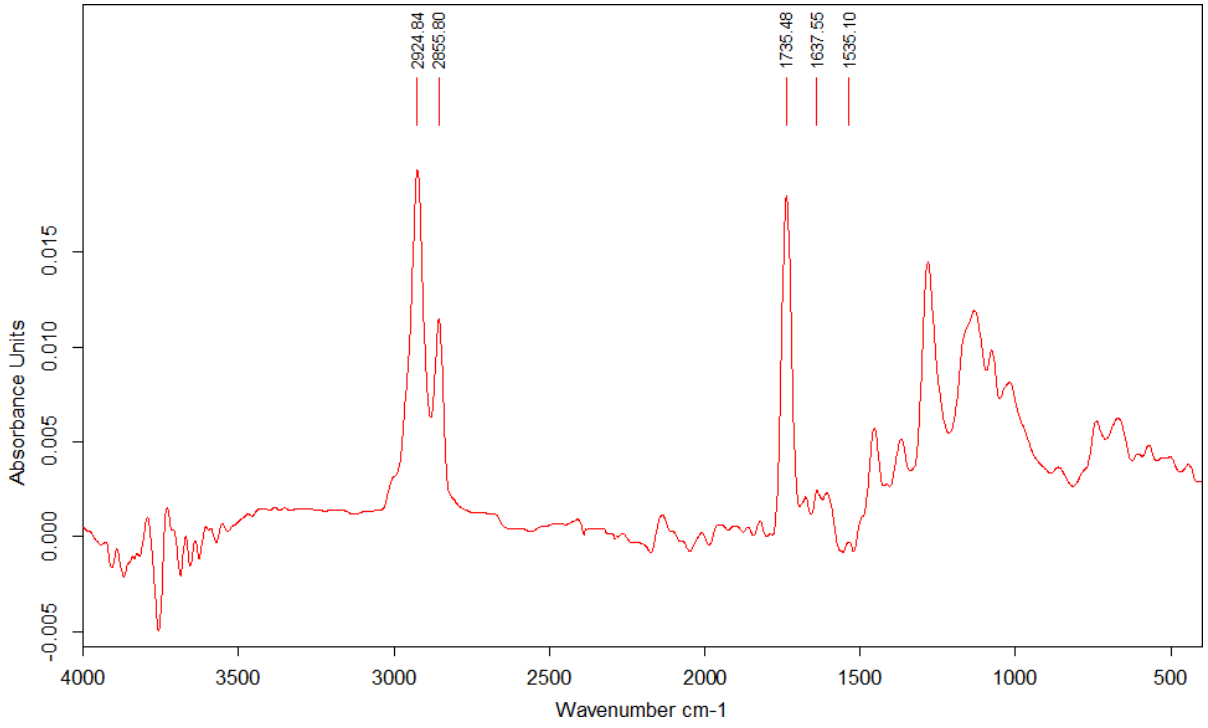


Figure III.4 : Spectre FTIR de la pectine extraite par H_2SO_4 à 100°C pendant 60min

L'analyse de les figures III.3 et III.4 montre une grande similitude entre les deux spectres FTIR des pectines extraites par HCl et par H_2SO_4. Ces résultats montrent que la nature de l'acide n'a pas une influence significative sur les propriétés structurale des pectines extraites.

Rendement en huiles essentielles

L'hydrodistillation, la macération ainsi que l'hydrodistillation de graines prétraitées par une macération ont fournis des rendements en huiles essentielles nulles. Cela peut être dû :

- ✓ aux conditions opératoires d'extraction choisies.
- ✓ à la qualité des graines.
- ✓ à la méthode d'extraction.
- ✓ au contenu faible en huiles essentielles de ces graines.
- ✓ au contenu important en huiles végétales dans ces graines.

Il faut signaler que pour une seule et unique extraction réalisée dans les mêmes conditions opératoires de l'hydrodistillation on a pu avoir une phase de faible quantité contenant des traces d'huiles dispersées. Cependant ce résultat ne peut être pris qu'à titre inductif et pas comparatif pour des raisons de reproductibilité des résultats.

Caractérisation des hydrolats

Aspect organoleptique

A l'issue des hydrodistillations réalisées, l'hydrolat recueillis est de couleur limpide (figure III.5) avec une odeur prononcée des graines de citrouilles.

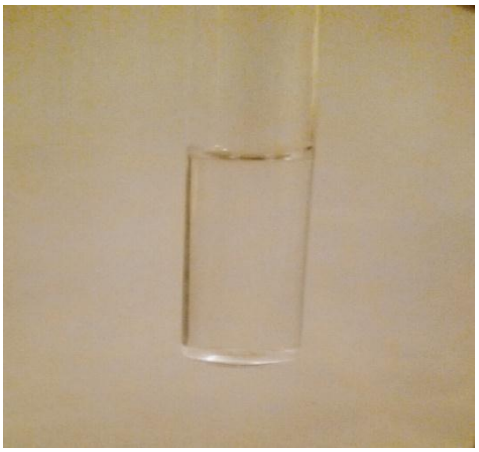


Figure III.5 : Hydrolat extrait des graines de citrouille

Le tableau III.6 récapitule l'aspect organoleptique de tous les hydrolats issus des différentes méthodes d'extractions adoptées dans ce travail. Le liquide de macération pendant 24 h est différent des deux hydrolats obtenus par hydrodistillation sans prétraitement des graines et par hydrodistillation précédée par une macération. La faible odeur du liquide de macération pendant 24h peut témoigner de l'absence des composés odorants responsables de la forte odeur des deux hydrolats extraits par hydrodistillation et par hydrodistillation des graines prétraitées par une macération. Ceci peut probablement traduire l'influence de la méthode d'extraction sur l'aspect qualitatif de l'hydrolat.

Tableau III.6 : Caractéristiques des hydrolats obtenus

	Aspect	**Couleur**	**Odeur**
Hydrolat d'hydrodistillation	Liquide Mobile	Presque incolore	Fort odeur
Hydrolat de macération	Liquide Mobile	Presque incolore	Fort odeur
Liquide de macération (24h)	Liquide un peu visqueux	Gris Verdâtre	Faible odeur

Densité

Les valeurs de la densité apparentes des hydrolats recueillis des trois modes d'extraction indiquées sur le tableau III.7 sont très proches voir identiques à celle de l'eau distillée, ce qui témoigne encore une fois l'absence avérée des huiles essentielles car ces dernières sont moins denses que l'eau distillée.

Tableau III.7 : Densité des hydrolats

Échantillons	Densité
Hydrolat	1.01
Hydrolat de macération	1
Liquide de macération (24h)	1.08

Indice de réfraction

Les indices de réfraction de tous les hydrolats obtenus ne s'éloignent pas de celui de l'eau distillée confirmant toujours l'absence des HEs dans ces hydrolats (Tableau III.8).

Tableau III.8 : Indices de réfraction des hydrolats des graines de citrouilles

Echantillons	Indice de réfraction
Hydrolat	1.333
Liquide de macération	1.3341
Hydrolat de macération	1.333
Huile	1.335
Eau distillée	1.333

Le pH

Il parait que les hydrolats issus la macération et des hydrodistillations des graines de citrouilles réalisées dans cette étude sont de nature basique car leur pH est égal à 8.

III.3.5 Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée *in vitro* en observant l'inhibition de la croissance de deux souches de bactéries *Echerichia.coli* et *staphylococcus aureus* en contact avec les hydrolats des graines de citrouille. Les résultats de cette étude donnant les diamètres et les pourcentages d'inhibitions des souches testées sont rassemblés dans le tableau III.9.

D'après les résultats obtenus, on observe que les disques imbibés d'hydrolats des graines de citrouilles issus des hydrodistillations et des macérations réalisées pourront être entourés des zones d'inhibitions dans certain cas, même elles sont de faibles diamètres mais ça indique l'existence d'un certain pouvoir inhibant de ces hydrolats (figure III.7). La grandeur de cette activité d'inhibition ne pourra être déduite qu'après la mesure des diamètres de ces zones d'inhibition et du pourcentage d'inhibition.

Tableau III.9 : Diamètre et % d'inhibition des souches bactériennes testées pour les hydrolats des graines de citrouilles

Échantillons	Souches	% inhibition	Diamètre (mm)
Hydrolat des graines non prétraitées	*Echerichia. coli*	12.22	11 (+)
	Staphylococcus	13.33	12 (+)
Hydrolat des graines prétraitées par macération	*Echerichia. coli*	10	9 (---)
	Staphylococcus	11.11	10 (+)
Liquide de macération	*Echerichia. coli*	10	9 (---)
	Staphylococcus	11.11	10 (+)
Huile dispersée en hydrolat	*Echerichia. coli*	11.11	10 (+)
	Staphylococcus	11.11	10 (+)

A partir des résultats du tableau III.9 on peut observer que :

- la souche bactérienne *staphylococcus aureus* est sensible à tous les hydrolats des graines de citrouilles.
- L'hydrolat a un effet inhibiteur sur les deux souches *Escherichia.Coli* et *Staphylococcus,* mais le pourcentage d'inhibition est un peu plus important sur la souche *Staphylococcus*.

- La souche *E. coli* n'a aucune sensibilité vis à vis l'hydrolat des graines prétraitées par macération et liquide de macération.
- L'huile dispersée dans l'hydrolat, l'hydrolat des graines prétraitées par macération ainsi que le liquide de macération ont un faible effet inhibiteur de la souche *Staphylococcus.*

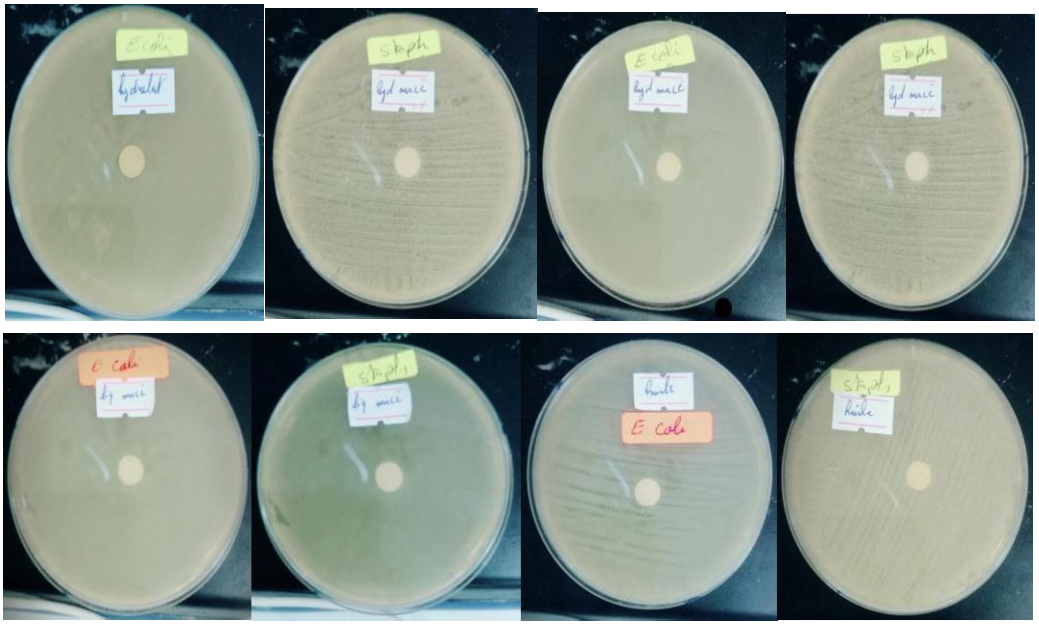


Figure III.7 : Résultats des aromatogrammes des hydrolats des graines de citrouilles

III.3.6. Polyphénols totaux par colorimétrie

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Au cours de ce dosage, la présence des polyphénols dans les extraits est confirmée par une apparition d'une couleur bleue après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu. La dégradation de la couleur bleue signifie une variation de la concentration des polyphénols dans les 4 hydrolats testés (figure III.8).

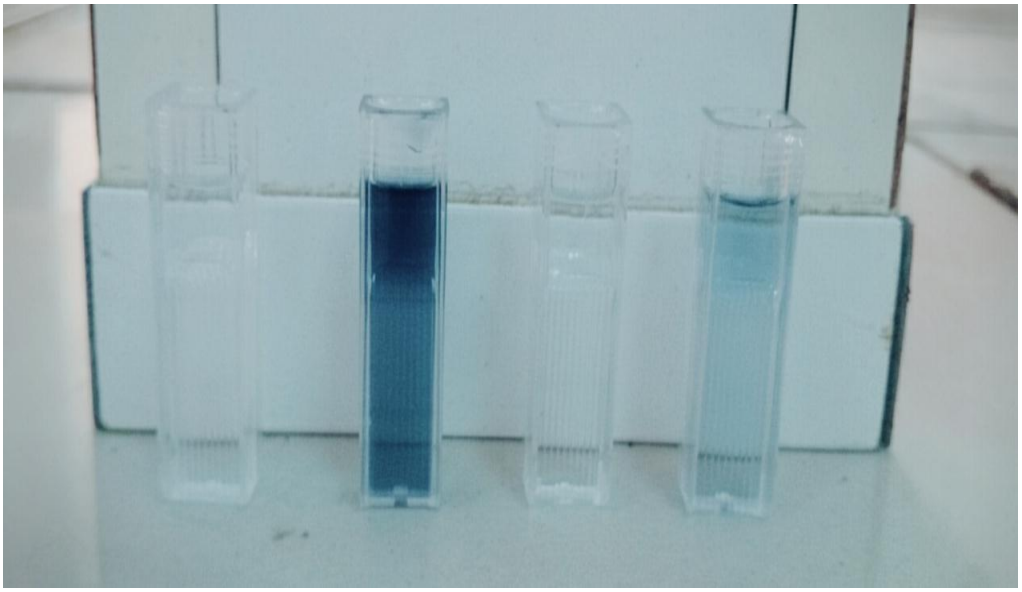


Figure III.8 : Dosage des polyphénols totaux

Les quantités des composés phénoliques ont été rapportées en milligramme d'équivalents d'acide gallique utilisé par gramme d'extrait. Les teneurs en PPT trouvés dans les hydrolats extraits des graines de citrouilles sont regroupées dans le tableau III.10.

Tableau III.10 : Teneurs en polyphénols totaux des hydrolats des graines de citrouilles

Échantillons	[PPT] (mg EAG/gMS)
Hydrolat de graines non prétraités	0.505
Liquide de macération	8.45
Hydrolat de graines prétraitées par Macération	0.095
Huile dispersée dans l'hydrolat	1.345

Ces résultats montrent que le liquide résultant d'une macération des graines de citrouilles pendant 24 h contient une quantité importante des polyphénols par rapport aux autres hydrolats. Ces valeurs sont bien supérieures de celles trouvées par Mohamed BENALIA [65] où les quantités de composés polyphénols s'échelonnent entre 19,80 et 46,39 mg équivalent acide gallique (GAE) pour 100 g de tourteaux de graines de citrouilles.

Conclusion générale

Conclusion générale

A travers ce présent travail on s'était proposé de valoriser une biomasse végétale qui est les graines de citrouilles par l'extraction des biomolécules à savoir les substances pectiques et les huiles essentielles.

Pour ce faire, nous avons procédé, lors du premier volet de ce travail, à l'extraction des substances pectiques par voie acide à chaud à partir des graines de citrouille. L'extraction a été réalisée sous différentes conditions opératoires (température, temps et nature d'acide). Les produits obtenus ont été soumis à des analyses physicochimiques appropriés (analyse par FTIR, détermination de DE, teneur en méthoxyle, teneur en cendres…).

Les résultats obtenus montrent que le rendement en pectine dépend de la température et du temps d'extraction et que le meilleur rendement (5.5%) est obtenu à 100°C après 120 min d'extraction et ceci pour les deux pectines extraites par HCl et par H_2SO_4. L'analyse de ces pectines montre qu'il s'agit de pectines faiblement méthylées avec des degrés d'estérification de l'ordre 50% et 33.33% et de poids équivalents élevés de l'ordre de 1745.08 mg/mol et 1837mg/mol enregistrés pour les pectines extraites par H_2SO_4 et HCl respectivement. La caractérisation par la spectroscopie FTIR montre que les substances extraites marquent les principaux pics caractéristiques des substances pectiques dans les alentours de 1740 cm^{-1} et 1644 cm^{-1} correspondant aux groupements $COOCH_3$ et COO^- respectivement.

Dans le deuxième volet, l'accent a été mis sur l'extraction des huiles essentielles à partir des graines de citrouille par hydrodistillation et macération à chaud. Les résultats obtenus révèlent que dans la mesure des conditions opératoires choisies dans cette étude, il était impossible d'aboutir à séparer les huiles essentielles de ces graines. Cependant, la caractérisation physicochimique des hydrolats obtenus, montre qu'il s'agit des liquides mobiles presque incolores de forte odeur ayant un caractère basique avec un pH de 8. Leurs densités et indices de réfractions sont presque identiques à ceux de l'eau distillée.

L'activité antibactérienne réalisée par la méthode de diffusion sur gélose montre que tous les hydrolats ont un effet inhibiteur sur les deux souches *Escherichia.Coli* et *Staphylococcus*, mais le pourcentage d'inhibition est un peu plus important sur la souche *Staphylococcus.*

Toutefois, il faut signaler que ce travail est loin d'être achevé et il serait intéressant de développer les points suivants :

- ✓ Procéder à d'autres techniques d'extraction des pectines en étudiants les principaux paramètres modulants le rendement et les propriétés structurales.
- ✓ Procéder à des techniques d'extraction des huiles essentielles à partir des graines de citrouilles permettant d'obtenir de bons rendements.

Références bibliographiques

[1] https://fr.wikipedia.org/wiki/Cucurbitaceae,

[2] Blanchard Olivier.(1981).Output, the Stock Market, and Interest Rates. American EconomicReview. Vol 71(1): 132-43

[3] Mohamed Benalia, Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées, thèse doctorat (2016).

[4] http://noillfr.bitballoon.com/mdicament2/citrouille-les-propr2265

[5] Musset Danielle & Grange Sylvie (éds.), 2000. Espèces de courges : culture et usages des Cucurbitacées. Mane, Alpes de Lumière ; Cavaillon, Musées et patrimoine de Cavaillon ; Barbentane, Equinoxe. 144 p.

[6] Phillips K M, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. J Agr and Food Chem. 2005;53:9436–9445.

[7] Berges RR., Windeler J., TrampischHJ.,SengeT. (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

[8] Bazzano Lydia A., Mary K., SiminLiu. (2003).Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. CurrentAtherosclerosisReport. Vol 5(6) :492-499.

[9]https://xibaaru.sn/secrets-de-femmes/8-raisons-de-consommer-graines-de-citrouille/

[10]Percheron F; Perles R &Foglitti M. J. (1981). Glucides. Structure et proprieties. Abrégé de biochimie générale. Éd : Université RénéDexartes, Paris. P : 31 -33.

[11]Rioux L ; 2010. Caractérisation structurale et évaluation de l'activité biologique de polysaccharides extraits de saccharinalongicruris Thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval : 4-41

[12]Izydorczyk M. Food carbohydrates :Chemical and physical properties and applications.P :165 ,2005

[13]Glickman M. Origines et classification des hydrocolloides,deshydrocolloides alimentaires, Florida,P :1,3-18,1982.

[14] ZHANG W., XU P. and ZHANG H., 2015-Pectin in cancer therapy: A review. Trends in Food Science &Technology. Article in press, 1-14.

[15](PILNIK, W ; VORAGEN, A.G.J (1979). The blo-chemistry of fruits and their products. (Hulme, A.C eds), London : Academic press, 1 p 53

[16] KIRK, OTHMEN, ENEYEL, (1967) Pectic sub-stances, Chem. Technol, 14 pp 636- 651

[17] THIBAULT, JF ; PETIT, R (1979) Les substances pec-tiques : Les polymères végétaux, polymères parié-taux et alimentaires non azotés, (Monties, B. eds. Bordas), Paris

[18] FISHMAN, M. L ; PEPPER, L ; DAMERT, W. C ;BAFORD, R. A (1986) Chemistry and function ofpectin, (Fishman M. L and JEN JJ eds.), ACS series 310, Washington

[19] (Eric AUBREE, Systems Bio Industries (SBI), Centre de Développement Alimentaire, Baupte, Carentan)

[20] BELHAMRI RACHIDA. « EXTRACTION DES MACROMOLECULES PARIETALES DES EAUX DE PRESSE DE BETTERAVES SUCRIERES ETUDE DE LEUR COMPOSITION, DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET de leur effet sur le process sucrier ». Thèse De Doctorat. Universite de reims champagne – ardenne.2005.

[21] Ralet, M.C., Bonnin, E. and Thibault, J.F., "Pectins. In: Biopolymers vol.8, Polysaccharides II", Steinbüchel, A., Ed, Wiley-VCH VerlagGmbh, Weinheim, (2002), 345-380.

[22] OWENS, H. S :McCREADY, RM ; Mac LAY W. D(1949). Gelation characteristics of acid-precipita-ted pectinates.3, 77- 82

[23] MAY, C. D (1990). IndustrialPectins : Sources,Productions and applications. CarbohydratePolymens. 12, 79-99

[24] REES, DA (1970). Structure, conformation andmechanism in the formation of polysaccharide gelsand networks. In advances in CarbohydrateChemistry and

Biochemistry, Vol. 24, M.L.wolfrom, R. S Tipson, and D. Horton(Editors)Academic Press, New York

[25] LARDY J-M.& HABERKORN. V (2007) l'aromatérapie et les huiles essentielles revue de kinésitérapie, 61, 14-17.

.[26] (Benayad,N.2008).:les huiles essensielles extrait des plantes médicinales marocaines moyen eficace de lute contre lesravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche université mohammed 5 – agdal laboratoire des substance naturelles et thermolyze Éclair Département de chimie faculté des siences de rabat P 61

[27] (BACIS, 1999). Boelens Aroma Chemical information Service (BACIS) (1999) - ESO 2000, the complete Database of Essential Oils. Leffingwell and Associates publisher, Georgia, USA.

[28]Bruneton J. 1999. Pahrmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Deuxième édition, Lavoisier, Paris. 915p.

[29] CROTEAU R., KUTCHAN T.M. & LEWIS N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, 1250-1268.

[30] HERNANDEZ-OCHOA L.R. (2005). Subtitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctoratde l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

[31] (Faye et al., 1997).**Faye O „LO M (1997)** connaissances et circuits thérapectiques relatifs au paludisme en zone rutale Sénégalaise Médecine tropicale ;57 1 6 1 -164

[32] (Abou Zeid, 2000)

أبوزيد ن.ح (2000) - الزيوت الطيارة الدار العربية للنضر و التوزيع القاهرة 256 صفحة

[33] DuraffourdC., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990) -Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.

[34] Eisenhut M. (2007) - The toxicity of essential oils,.article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.

[35] Grysole J. (2004) - La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 139-141.

[36] Nicole M. (1996) - Aperçu de l'aromathérapie. Info.essence.2 :4-5.

[37] France-Ida J. (1996) - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence. 3 : 5-6.

[38] (Anes et al., 1968 in Benjilali, 2004) Benjilali B. (2004) – Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.

[39]Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997) – Correlationbetweenchemical composition and antimicrobialactivity. VI. Activity of some African essential oils. J. Essent. Oil Res., 9: 67-75.

[40] (Haekel et Omar, 1993)

هيكل م.ا و عمر ع.ع(1993) النباتات الطبية و العطرية.كيمياؤها و انتاجها وفوائدها . منشأ المعارف بالإسكندرية.

[41] Bego Ph. (2001) - Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, pp.2-3.

[42] Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.

[43] (Abou Zeid, 1988).

أبوزيد ن.حي,(1988) - العطرية و منتجاتها الزراعية و الدوائية.الدار تاعربية للنشر و التوزيع القاهرة 472 صفحة

[44] Paris M.et Hurabielle M. (1981) – Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339

[45]Wichtel M. et Anton R. (1999) - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.

[46] AKM Azad; MA Ali; M SorifaAkter; M Rahman; M Ahmed, *Journal of Food and Nutrition Sciences*, **2014**,2(2), 30-35.

[47] VO Aina; MM Barau; OA Mamman; A Zakari; H Haruna; MS Hauwa-umar; YB Abba, *British Journal ofPharmacology*and*Toxicology*, **2012**, 3(6), 259-262.

[48] S Ranganne. Handbook of analysis and quality control for fruits and vegetables products, 92nd Edition, McGraw Hill publishing Ltd., New Delhi, **1995**, 33-43.

[49] S Mohammed; Z Hasan, *ASEAN Food Journal*, **1995**, 2, 43-50.

[50] USP 26 NF 21. "The United States Pharmaciopia – The National Formulary", Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, (2003), 1401-1402

[51] Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., &Robards, K. (2005b).

Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9911–9920.

[52] (Vincent, 1991;Kavbouche et al., 2005; Ormeno et al., 2005). VINCENT M.C., 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6

[53] KAVBOUCHE Z., BOUTAGHANE N., LAGGOUNE S. ET KABOUCHE K., (2005). International Journal of Aromtherapy; Vol. 15; pp. 129-133.

[54] Ormeno et al., (2005) ORMENO E., FERNANDEZ C. ET MEVY J., (2007). Plant coxistence alters terpeneemissio and content of mediterrranean species-Phytochemistry; Vol. 68 ;pp 840-852

[55] OUIBRAHIM A., (2015). « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (Laurusnobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinusofficinalis L.) de l'Est Algérien » ; Thèse de doctorat ; Univ. BadjiMokhtar – Annaba.

[56]CARSON C.F., HAMMER K.A. & RILEY, T.V., (19956). Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of Escherichia coli and Slaphylococcusaureus to the essential oil of Melaleucaallernifoha (tea tree oil). Microbios 82, 181-5

[57] CVALLO J. D., CHARDON H., CHIDIAC., CHOUTET P., COURVALIN P., DABERNAT H., DRUGEON H., DUBREUIL L., GOLDSTEIN F., JARVALIER V., NICOLAS - CHANOINE., PNILIPON A., QUENTIN C ., ROUVEIX B., SIROT J., et SOUSSY C.J., (2006). Communiqué de la comité francaise de l'antibiogramme. Société Francaise de Microbiologie. Ed : de janvier.

[58] FELLAH A. ET MOUAICI N., (2015). Etude d'extraction et del'activitéantioxydante et antibactérienne des extraits de la verveine ″Lippiacitriodora″ ; Mémoire de master ; univ. DjilailbouNaama .KhemisMiliana.

[59] Charity U. Ogunka-Nnoka* and Mary F. Atinlikou, Extraction and Characterization of Pectin from some selected non-citrus agricultural food wastes, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2016, 8(5):283-290

[60] IPPA. International Pectin Producers Association. Retrieved from www. Interscience.com

[61] VO Aina; MM Barau; OA Mamman; A Zakari; H Haruna; MS Hauwa-umar; YB Abba, *British Journal ofPharmacology*and*Toxicology*, **2012**, 3(6), 259-262.

[62] A Kumar; GS Chanchan, *Carbohydrate Polymer*, **1992**, 82, 454-459.

[63] NSM Ismail; N Ramli; NM Hani; Z Meon; S Mlaysiana, **2012**, 41, 41-45.

[64]Food Chemical Codex. IV. Monographs, National Academy Press, Washington DC, **1996**, 283.

[65] Mohamed Benalia, Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées, thèse doctorat (2016).