

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمجد بوكرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie organique

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Présenté et soutenu par :

RAMDANI Nisrine

CHERIYEN Sara

Soutenu le : 29/ 09 /2019

THEME

Evaluation de l'activité antioxydante d'un biopolymère extrait à partir des graines de lin.

Devant le jury composé de :

M ^{me} BENSAADI F-Z	MCA	UMBB	Présidente
M ^{me} F.BENOUDJIT	MCB	UMBB	Examinatrice
M ^{me} L.LOUCIF SIEAD	MCB	UMBB	Examinatrice
M ^{me} DEMIM Soraya	MCB	UMBB	Promotrice

Année Universitaire : 2018/2019

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon cher père qui m'a beaucoup aidé avec son soutien tout au long de mes études.

A ma chère mère qui ma entourée avec sa tendresse et qui n'a cessé de prier pour moi.

A mon cher mari pour ses encouragements permanant, et son soutien moral.

A mes frères: Ahmed et Abdelghani.

A mes sœurs : Faiza et Meriem.

A tous mes amis et mes proches sans exceptions qu'ils soient proches ou loin.

A toute la promotion de Chimie Organique

Nisrine.

Dédicace

*Avant tous je remercie le dieu qui m'a donné la volonté, le courage et la
patience durant mes 5 ans d'études.*

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes parents, qui m'ont toujours
encouragé et conseillé, tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon
respect.*

*A mes chères sœurs Asma et Zineb, vous étiez toujours là pour m'écouter, me
réconforter et m'encourager dans les moments de doute... Tous les mots ne
suffiraient pas... Sans vous*

A mes chers frères Hicham, Abdelnnour et Oussama

*A mes très chères amies : Dhawya, Imen et Ahlem pour leur présence à mes
côtés*

Et en fin à tous mes amis de la promo de master chimie organique

Sara.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la Volonté de terminer ce travail.

No vifs remerciements s'adressent à nos parents qui nous ont aidés à la réalisation de ce modeste mémoire.

Notre plus grande gratitude va à notre promotrice, Mme DEMIM, pour sa disponibilité et la confiance qu'il nous a accordé.

Je tiens à remercier M^{me} BENSAADI de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

A M^{me} BENOUDJIT et M^{me} LOUCIF SIEAD d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail, qu'elles trouvent ici notre sincère gratitude.

Un grand merci à M^{me} BOULDJENNET Faiza doctorante au département de Biologie, pour son soutien et son aide tout au long de la pratique.

A toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de la partie pratique de notre mémoire.

Liste des tableaux :

Tableau I.1 Classification de lin.....	3
Tableau I.2 Acides gras essentiel dans les grains de lin.....	6
Tableau I.3 Teneur en minéraux de lin	6
Tableau I.4 Le lin -Bienfaits potentiel pour la santé.....	9
Tableau I.4 Composition du mucilage de la graine de lin.....	10
Tableau II.1 Différents types des espèces réactives	13
Tableau IV.1 la matrice d'extraction.....	25
Tableau IV.2 Facteurs étudiés dans la matrice.....	26
Tableau V.1 Résultat de taux du mucilage.....	31
Tableau V.2 Estimations des coefficients triés.....	32
Tableau V.3 Analyse de la variance concernant le taux du mucilage.....	33
Tableau V.4 Concentration du mucilage à doser.....	36
Tableau V.5 Concentration du mucilage à doser.....	37
Tableau V.6 Principales bandes caractéristiques des groupes fonctionnels des polysaccharides extraits analysés par spectroscopie infrarouge	38

Listes des figures :

Figure I.1 Fleur bleue de <i>Linum Usitatissimum</i>	3
Figure I.2 Planche ancienne de <i>linum usitatissium</i>	4
Figure I.3 Représentations schématiques de la graine de lin	5
Figure I.4 Principale tocophérol dans les graines de lin.	7
Figure I.5 Structures de quelques acides phénols	8
Figure I.6 Structure du flavane	8
Figure II.1 La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	12
Figure II.2 Formule du GSSG.....	16
Figure II.3 Formule du GSH.....	16
Figure II.4 Structure de la vitamine C.....	17
Figure II.5 Structure de la β _carotène.....	17
Figure III.1 Exemple de domaine d'application des ultrasons en fonction de la fréquence et de la longueur d'onde	19
Figure III.2 Schéma démonstratif de la cavitation	20
Figure III.3 Impact de l'implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'une cellule Végétale.....	21
Figure IV.1 Les graines de lin	23
Figure IV.2 Plan Box-Behnken pour trois facteurs.....	24
Figure IV.3 Principe de fonctionnement d'un spectromètre IR.....	28
Figure IV.4 Structure chimique de DPPH	29
Figure IV.5 Réaction de réduction du radical libre DPPH	29
Figure V.1 Taux de mucilage (valeurs observées) en fonction des valeurs prédites.....	34
Figure V.2 Courbe d'étalonnage des sucres totaux.....	35
Figure V.3 Courbe d'étalonnage en protéine BSA.....	35
Figure V.4 Spectre IR-TF du polysaccharide extrait des graines de lin.....	37
Figure V.5 pourcentage d'inhibition du radical DPPH(%)	39
Figure V.6 Inhibition de radical hydroxyl	40

Abréviations :

ALA	acide alpha-linolénique
BHA	butylhydroxyanisole
BHT	butylhydroxytoluène
BSA	bovine serum albumin
° C	degré celsius
CM	carré moyen
ddl	degré de liberté
DPPH	1,1diphényl 2 pycrilhydrazil
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
EOR	espèces oxygénés réactives
F°	statistique de Fisher
FTIR	infrarouge à transformée de Fourier
GPx	glutathion peroxydase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
HMF	hydroxy-méthylfurfural
IR	infrarouge
IU	intensité ultrasonique
KHz	kilohertz
LA	acide linoléique
N.D	non détecté
P	probabilité
PG	gallate propylée
R ²	coefficient de corrélation
rpm	rotation par minute

SDG sécoisolariciresinol diglucoside

SS somme des carrés

TBHQ tétrabutylhydroquinone

UV ultra-violet

Glossaire :

Cotylédon	Feuille primordiale caractéristique de l'embryon de plantes à fleur située dans la graine. Les graines des plantes monocotylédones comportent un seul cotylédon (blé, maïs) ; celles des dicotylédones en comportent deux (haricot, pois, marronnier) ; celles des conifères en comporte de dix à douze. Les cotylédons sont souvent chargés de réserves.
Endosperme	L'endosperme est un tissu végétal de réserves nutritives dans la graine des Gymnospermes ou des préspermaphytes. Il s'étend de l'assise protéique jusqu'au cœur du grain. Il provient de la différenciation du gamétophyte femelle suite à la fécondation. Il est haploïde, et donc génétiquement dissemblable de la plante-mère (lin).
Epiderme	l'épiderme est un tissu de revêtement extérieur des parties aériennes d'une plante, dont la fonction protectrice est assurée par la cuticule. Épiderme du fruit. Couche extérieure, surface d'un objet (graine de lin).
Le spermoderme	Identifie le tégument d'une graine, parfois limité à la couche externe ou au testa, le testa formant l'enveloppe protectrice de l'embryon, comme la peau ou une cuticule d'une semence.
Laxatif	Un laxatif est un traitement médicamenteux qui entraîne l'accélération du transit intestinal.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	
I.1 Plante... ..	3
I.1.1 Classification	3
I.1.2 Description botanique	4
I.2 La graine	4
I.2.1 Morphologie et microstructure des graines de lin	5
I.2.2 Composition	5
I.2.2.1 Lipide	6
I.2.2.2 protéine	6
I.2.2.3 Minéraux	6
I.2.2.4 Tocophérol	7
I.2.2.5 Polyphénols	7
I.2.2.6 Glucides	8
I.2.3 Domaines d'application	9
I.3 Mucilage	10
I.3.1 Définition	10
I.3.2 Structure et composition	10
I.3.3 Propriétés de mucilage	11
Chapitre II : Activité antioxydante	
II.1 Stress oxydant	12
II.1.1 Origine du stress oxydatif.	12
II.1.2 Les espèces réactives de l'oxygène	12
II.1.3 Radicaux libre.	13
II.2 Antioxydant	13
II.2.1 Mécanismes d'action des antioxydants.	14
II.2.2 Système de défense antioxydante	14
II.2.2.1 Les antioxydants naturels	14
II.2.2.1.1 Antioxydant enzymatique	14
II.2.2.1.2 Antioxydant non enzymatique.....	16

II.2.2.2 Les antioxydants synthétiques	18
--	----

Chapitre III : L'extraction assistée par Ultrasons

III.1 L'extraction assistée par Ultrasons.....	19
III.1.1 Définition :	19
III.2 Principe de l'extraction par ultrason :	20
III.3 Paramètres influençant la cavitation :	21
III.3.1 Température :	21
III.3.2 Amplitude	21
III.3.3 Temps	21
III.4 Avantages de l'extraction par ultrason.....	22

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1 extraction de mucilage	23
IV.1.1 Matériel végétal	23
IV.1.2 Procédure d'extraction et purification des polysaccharides.....	23
IV.1.3 Plan d'expérience	23
IV.2 Caractérisation des mucilages	26
IV.2.1 Caractérisation biochimique	26
IV.2.1.1 Dosage des Sucre totaux.....	26
IV.2.1.2 Dosage des protéines par la méthode de Bradford	27
IV.2.2 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	27
IV.3 Evaluation de l'activité antioxydante	28
IV.3.1 Test anti-radicalaire pour le dosage du DPPH	28
IV.3.2 Test anti-radicalaire (radical hydroxyle OH)	30

Chapitre V : Résultat et Discussion

V.1.1 Extraction de mucilage	31
V.2 Caractérisation du mucilage	35
V.2.1 Caractérisation biochimique	35
V.2.1.1 Dosage des sucres totaux	35
V.2.1.2 Dosage des protéines	36
V.2.2 Analyse des mucilages par la FTIR	37
V.3 Evaluation de l'activité antioxydante.....	38
V.3.1 Activité anti-radicalaire du DPPH	38

V.3.2 Test anti-radicalaire (radical hydroxyle OH)	39
Conclusion	41
Référence bibliographique.....	43
Annexe	

Introduction générale

Introduction

L'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants est précaire. Pour maintenir cet équilibre, une alimentation variée est nécessaire. On trouve de nombreux antioxydants dans l'alimentation, que ce soit dans les fruits, les légumes ou les boissons. Une modification des habitudes alimentaires a été observée ces dernières décennies avec notamment le développement des « fast-food » et la consommation de produits surgelés qui perdent une partie de leurs vitamines. Ainsi l'apport exogène en antioxydants diminue et peut favoriser l'apparition de certaines pathologies induites par ces carences.

En effet, les antioxydants sont principalement apportés par les végétaux, on y retrouve notamment les polyphénols, les vitamines ainsi que les oligoéléments.

C'est en ce sens que l'étude de l'activité antioxydante des plantes est aujourd'hui devenue importante, car on peut retrouver dans les végétaux de puissants antioxydants. Le lin (*Linum usitatissimum*) fait partie des plantes les plus employées en médecine traditionnelle en raison des diverses propriétés de ses différentes parties notamment sa graine qui est documentée pour avoir un rôle bénéfique pour la santé. La graine de lin englobe de nombreux composés et éléments biologiquement actifs.

Les mucilages extraits des graines de lin sont riches en polysaccharides, polyphénoliques, et en acides gras essentiels, ce qui permet de lutter contre le stress oxydatif.

L'objectif de ce travail est d'extraire un biopolymère (mucilage) à partir des graines de lin et tester son activité antioxydante afin de le comparer avec un antioxydant standard.

Le travail expérimental réalisé est subdivisé en deux parties :

1^{ère} partie :

- ✓ Extraction d'un biopolymère à partir des graines de lin par la méthode d'ultrason.
- ✓ Caractérisation biochimique de l'extrait de lin (sucres et protéine).
- ✓ Analyse infra-rouge qui permettra de caractériser l'extrait de lin.

2^{ème} partie :

Test de l'activité antioxydante du biopolymère extrait sur les radicaux libres.

Le mode de présentation de ce mémoire est divisé en deux parties, nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier concerne une généralité du lin, graines et mucilage, le deuxième chapitre est consacré à l'activité

antioxydante et le troisième chapitre identifie la méthode d'extraction par ultrason. La deuxième partie (partie expérimentale), décrivant les principaux procédés utilisés dans cette étude avec la présentation des résultats et la discussion. Notre travail est achevé par une conclusion et des perspectives.

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre I

Lin (linum usitatissimum)

I.1- Plante :

Le lin (*Linum usitatissimum*) est une plante annuelle de la famille du même nom (Linacées). Le lin est semé et récolté sensiblement de la même façon qu'une céréale printanière et arrive à maturité en même temps que le blé. Ses fleurs ont cinq pétales (habituellement bleus, mais parfois blancs) (figure 01) et produisent une drupe ou capsule (le fruit) contenant jusqu'à dix petites graines ovales et plates (Rowland,2013).

Il existe plus de 200 variétés de *Linum usitatissimum*, le lin cultivé de façon sélective, est utilisé principalement soit pour ses graines ou pour ses fibres (Tahir et al ; 2011).



Figure I.1 : Fleur bleue de *Linum usitatissimum* (Jean, 2018).

I.1.1- Classification :

La famille du Linaceae est géographiquement répandue avec environ 300 espèces dans le monde entier.

Cette famille est positionnée dans le royaume des plantes comme suit (Tableau I.1) :

Tableau I.1 : classification de lin (Diederichsen et Richards, 2003).

Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
sous- division	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Linales

Tribu	Linoideae
Famille	Linaceae
Genre	Linum
Espèce	Linum usitatissimum (espèce cultivée actuellement)

I.1.3- Description botanique :

Le lin possède une courte racine pivotante pourvue de racinelles fibreuses de longueur variable allant jusqu'à 120 cm. Les feuilles disposées tout le long de la tige dressée sont simples et sessiles et d'une longueur de 25 mm environ. La tige est plus ou moins ramifiée selon la densité de semis. Pour une densité de semis de 2000 graines/m² la taille des lins fibres varie entre 0.8 et 1.2 m alors qu'elle atteint 0.5 à 0.7 m pour les lins graines semés à 400 graines/m² (Casa et al., 1999).



Figure I.2 : planche ancienne de *linum usitatissimum*.

1.2. La graine :

La graine de lin (*Linum usitatissimum* L.) provient du lin, une plante annuelle. La principale importance de la graine de lin est dans le secteur de la nutrition humaine, car elle est en train de devenir un ingrédient alimentaire fonctionnel important grâce au contenu en composés actifs censés apporter des bénéfices pour la santé (Bernacchia et al., 2014).

1.2.1. Morphologie et microstructure des graines de lin :

Les graines de lin ont une coque dure, lisse et brillante, et leur couleur varie de l'ambre foncé au brun rougeâtre, selon que le lin est de la variété dorée ou brune. (Daun JK et al, 2003).

La graine de lin est plate, ovale avec une extrémité pointue. Ses dimensions sont réduites (2,5 × 5 × 1 mm ; 3-13 mg) (GROS Cécile et al., 2005).

La graine de lin possède une microstructure caractéristique (C, D et E, (Figure I.3)), chaque tissu ayant une fonction physiologique propre. L'amande est protégée contre les pathogènes et les contraintes mécaniques par le tégument. Celle-ci est composée du spermoderme et de l'épiderme. Différentes assises cellulaires composent le tégument (en partant de l'intérieur vers l'extérieur, (Kadivar, 2001) (D et E, (Figure I.3)):

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

L'amande de la graine est composée de l'embryon, de deux cotylédons plats et de l'endosperme (B et C, (Figure I.3)).

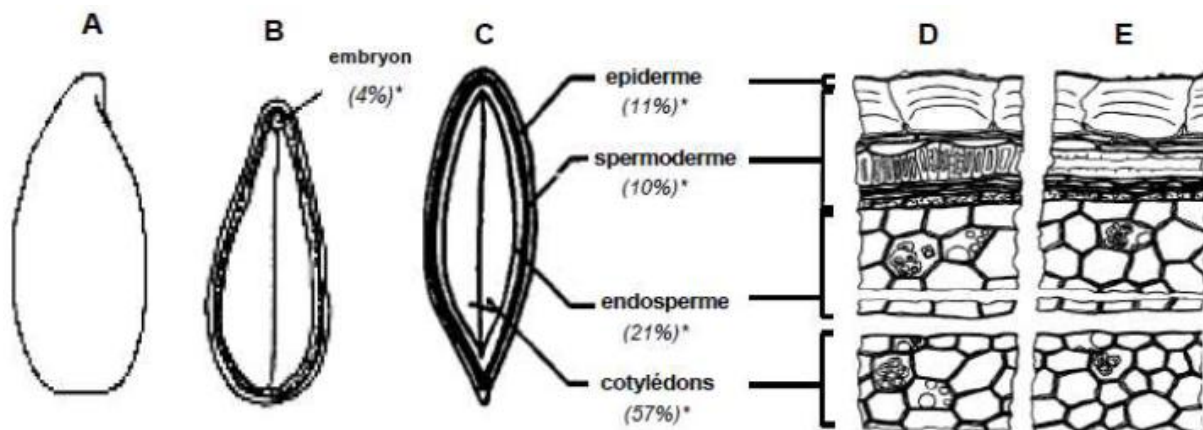


Figure I.3 : Représentations schématiques de la graine de lin, (Daun *et al.*, 2003; Peterson, 1958).

I.2.2- Composition :

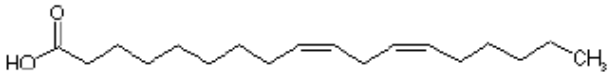
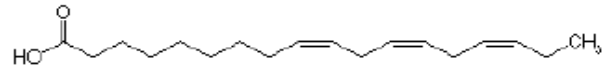
La graine de lin contient des protéines, des fibres alimentaires, des polysaccharides, des composés polyphénoliques et des acides gras essentiels bénéfiques pour la santé. Sa teneur en

acide alpha-linolénique (ALA, un acide gras oméga-3 essentiel), en fibres alimentaires et en lignanes présente un intérêt spécial pour les consommateurs, les fabricants de produits alimentaires et les chercheurs (Vaisey-Gaiser et al ; 2003).

I.2.2.1. Lipide :

Les graines présentent une importantes teneur en huile : de 30% à 60% et cette huile est particulièrement riche en acide alphalinoléique (ALA) oméga-3 qui est représentant près de 60% ; et contient seulement 15% de l'acide linoléique- (LA) oméga-6 (P.Weill et al., 2010).

Tableau I.2: acides gras essentiel dans les grains de lin (Daun et al., 2003; Oomah et al., 1997)

Nom de l'acide gras	Formule développée
Acide linoléique	
Acide α- linoléique	

I.2.2.2. protéine :

La graine de lin contient environ 20-30% en masse de protéines comprenant les albumines et les globulines (Bhatty, 1995). La protéine de lin contient une relativement forte proportion d'arginine et d'acide glutamique, tandis que la lysine est l'acide aminé le plus limitant suivi de la méthionine et de la cystéine (Rabetafika et al., 2011).

I.2.2.3. Minéraux :

Les minéraux contenus de la graine sont montrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau I.3 : Teneur en minéraux de lin (Anonymous Contractual analyses, 1997).

Minéraux	mg/100 g
Calcium	236
Cuivre	1
Fer	5
Magnésium	431
Manganèse	3
Phosphore	622
Potassium	831
Sodium	27

Zinc	4
------	---

I.2.2.4. Tocophérol :

La vitamine E est présente en abondance au lin principalement comme gamma-tocophérol. (Daun JK et al, 2000). Ce dernier est un antioxydant qui protège les protéines cellulaires et les graisses d'oxydation ; favorise l'excrétion de sodium dans l'urine, ce qui peut aider à réduire la pression artérielle et contribue à réduire le risque de maladie cardiaque, de certains types de cancer et de la maladie d'Alzheimer. (Morris MC et al., 2005 ; Sen CK, et al., 2006). La teneur en tocophérol du lin est affectée par la variété, maturité de la graine, zone de culture, conditions et méthode de croissance d'extraction (Daun JK et al., 2003).

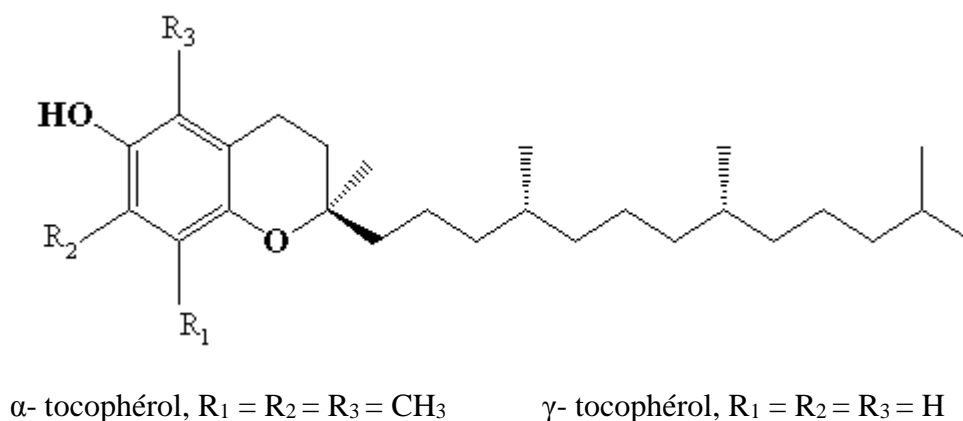


Figure I.4 : principale tocophérol dans les graines de lin

I.2.2.5- Polyphénols :

La graine de lin possède des profils riches en composés phénoliques (Krajčova et al., 2011; Thompson et al., 1991). Elle contient au minimum trois groupe principaux de ces composés qui sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les lignanes.

- **Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (Haslam, 1994). Les graines de lin possèdent une faible quantité des ces acides (1%) (Muir ,2006).

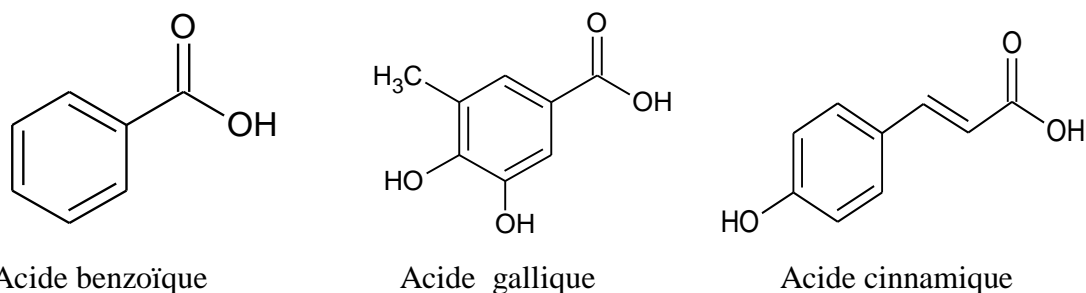


Figure I.5 : Structures de quelques acides phénols (bruneton, 2009 ; pawlowska et al.,2006)

▪ Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné, cycle C (bruneton, 1999 ; Elicoh-Middleton et al., 2000).

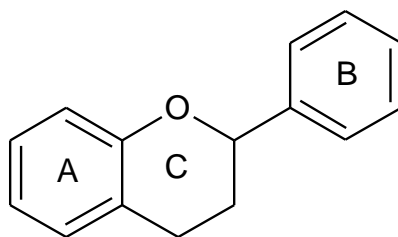


Figure I.6 : Structure du flavane (bruneton,1999 ; Elicoh-Middleton et al., 2000).

▪ I.2.2.5.3- Les lignanes :

la lignane majeure identifiée dans la graine de lin est le SécoisolariciresinolDiGlucoside (SDG), ce dernier est un phytochimique important qui possède une propriété antioxydante. (Touré et al., 2010).

I.2.2.6- Glucides :

Le lin est pauvre en glucides (sucres et amidons), procurant seulement 1 gramme (g) pour 100g. Pour cette raison, le lin contribue peu à l'apport total en glucides ; il est recommandé aux personnes souffrant de maladies spécifiques. Le polysaccharide de graine de lin est composé de deux fractions principales : un arabinoxylane neutre (75%) et un rhamnogalacturonane acide (25%). L'arabinoxylane est composé principalement de xylose, d'arabinose et de galactose et le rhamnogalacturonane est constitué de L-rhamnose, de D-galactose, de D-galacturonique et d'acide L-fucose. La composition en monosaccharides, le rendement en glucides et la qualité des glucides varient considérablement entre les accessions de la collection mondiale de graines de lin (HoC et al., 2007).

1.2.3- Domaines d'application

Il a été apporté que la plante de lin exerce un effet anti oxydant et anticancéreux, (Bekhit et al., 2017).

Les graines de lin sont une source riche en acide alpha linoléique (ALA), lignanes et fibres alimentaires (Day et al., 2005). Les lignanes sont des phytoestrogènes, composés qui agissent comme les œstrogènes chez les animaux et l'homme.

De plus, le lin abaisse les concentrations en cholestérol total sérique et contribue à réduire le risque des maladies cardio et cérébro-vasculaire, en partie grâce aux actions de l'ALA (Mozaffarian,2005).

Par ailleurs, la consommation quotidienne du lin augmente l'apport en ALA. les fibres alimentaires du lin exercent un effet laxatif et aident au bon fonctionnement de l'intestin (Zhang et al., 2008).

Tableau I.4: Le lin -Bienfaits potentiel pour la santé (Zhao et al., 2004 ;Zhang et al.,2008).

Composés des graines de lin	Bienfaits potentiel pour la santé
Graine entière ou broyée	-Réduction du cholestérol total et du cholestérol LDL -réduction de la réponse glycémique postprandiale -diminution de l'inflammation et du risque de cancer
Fibre soluble Fibre insoluble	-Réduction de la cholestérolémie et du de la glycémie -Régularisation de la fonction intestinale
Acide alpha-linolénique (ALA)	-Réduction de la cholestérolémie et des concentrations de bio-marqueurs inflammatoires -Réduction du risque de coronaropathie, d'accident vasculaire cérébral et de cancer
Lignanes	-Traitement de l'hypertrophie de la prostate -Prévention du cancer (cancers du sein, du côlon et du poumon, leucémie) -Maîtrise de la néphropathie lupique (insuffisance rénale) -Réduction des risques liés aux maladies cardiovasculaires, aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, à la polyarthrite rhumatoïde et au diabète -Effet antitumorigène sur certains cancers -Effets hypocholestérolémiant

1.3- Mucilage :

1.3.1- Définition :

Le mucilage est une substance polymérique complexe de nature glucidique, avec une structure fortement ramifiée (Sepúlveda et al., 2007). Il est un constituant commun des végétaux, qui peut être extrait des graines ou des tiges molles, tel que les gombos (*Hibiscus esculentus*), psyllium (*Plantago*spécies), graine de moutarde (*Sinapis alba*) et les graines de lin (*linum usitatissimum*), ce dernier en contient 3 à 9 % (Izydorczyk et al., 2005 ; Oomah et al., 1995). L'enveloppe et l'endosperme de la graine de lin forme six couches, le mucilage provient du paroi secondaire de matériau dans la couche la plus externe (Daun et al., 2003).

1.3.2- Structure et composition :

Le mucilage de lin contient entre 50 et 80% de glucides et entre 4 et 20% de protéines et de cendres. Le constituant principal du mucilage de lin est constitué de deux composants polysaccharidiques, neutre et acide.

La fraction neutre contient de la L-arabinose, du D-xylose et du D-galactose dans un rapport molaire de 3,5: 6,2: 1 et la fraction acide contient du L-rhamnose, du L-fucose, du L-galactose et de l'acide D-galacturonique dans une mole dans un rapport de 2,6: 1: 1,4: 1,7.

Le polymère neutre est composé d'un arabinoxylane avec un squelette (1/4) b-D-xylane, auquel l'arabinose et les chaînes latérales de galactose sont attachées aux positions 2 et / ou 3.

Le polymère acide a un squelette constitué de résidus d'acide α -L rhamnopyranosyle (1/2) et d'acide D-galactopyranosyluronic (1/4) liés, avec des chaînes latérales de fucose et de galactose (Oomah et al., 1995).

Tableau I.5 : Composition du mucilage de la graine de lin (N.D. : non détecté).

Composant	Fraction neutre	Fraction acide
Rhamnose	3.1%	41.3%
Xylose	62.0%	3.5%
Fucose	6.6%	7.4%
Galactose	12.7%	22.2%
Arabinose	12.7%	N.D.
Acide galacturonique	2.3%	23.3%

1.3.3- Propriétés de mucilage :

▪ Propriétés laxatives :

La présence de mucilage dans la graine de lin justifie son emploi comme laxatif de lest (singh et al., 2011).les mucilage gonflent au contact de l'eau et forment un gel volumineux. L'absorption de ce gel permet d'augmenter la masse et l'hydratation du bol fécal, ce qui exerce une action dite de lest et stimule le péristaltisme (greenwald et al., 2001). Au niveau du côlon, une partie des fibres subissent une fermentation et favorisent de ce fait le maintien de la flore bactérienne (Ph Européenne,2013).

▪ Propriétés anti-inflammatoires :

Les mucilages de la graine de lin auraient aussi des propriétés anti-inflammatoires. Le gel formé avec l'eau recouvrirait la muqueuse digestive et la protégerait des processus inflammatoires comme les brûlures d'estomac ou les phases de colite chez les patients souffrants du syndrome de côlon irritable (bruneton, 2016).

▪ Hydratant :

Le gel de lin peut être utilisé aussi bien pour la peau que pour les cheveux. Le gel de lin est idéal pour les cheveux, il les nourrit en profondeur tout en leur apportant douceur et brillance. Le mucilage est également excellent pour la peau. Hydratant et raffermissant, il est possible de l'utiliser tel quel sur le visage ou sur le corps (Mourot,2017).

Chapitre II
Activité antioxydante

II.1- Stress oxydant :

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre des taux élevés de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et une activité antioxydante réduite. Une augmentation du stress oxydant peut entraîner des destructions tissulaires et provoquer des lésions au niveau des structures cellulaires. Ils sont responsable de nombreuses maladies chroniques, apparaît lorsque la production de DRO dépasse la capacité de neutralisation des antioxydants (Basharat Syed; 2015).

II.1.2- Origine du stress oxydatif :

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale a des facteurs pro-oxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Figure II.1) (Magder, 2006).

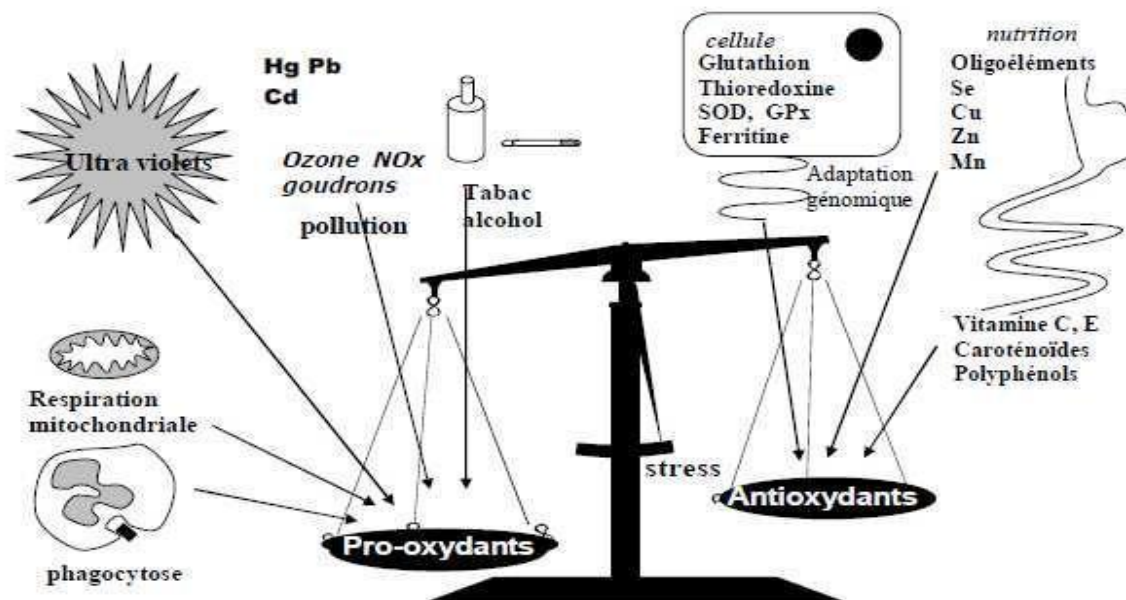


Figure II.1 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

II.1.3.1- Les espèces réactives de l'oxygène :

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène

(Radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (Bartosz, 2003. Halliwell et Whiteman 2004).

Tableau II.1 : Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}	Oxygène singulet	1O_2
Radical alkoxyde	RO^{\bullet}	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\bullet}	Peroxydinitrite	$ONOO^-$

II.1.3.2- Radicaux libre :

Un radical libre est une espèce chimique oxydante possédant un électron célibataire, ce qui la rend très fortement réactive. Cette réactivité est cependant variable suivant la nature du radical et des biomolécules qui en sont la cible. Généralement, sa durée de vie est extrêmement courte (de l'ordre de la milliseconde voire de la nanoseconde) (Majidi et al., 2010). Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient (Franceschini, 1994).

II.2- Antioxydant :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les antioxydants sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires) (Johnson et al., 2005).

II.2.1- Mécanismes d'action des antioxydants :

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Yaacoub, 2009 ; Hellal , 2011).

II.2.2- Système de défense antioxydante :**II.2.2.1- Les antioxydants naturels :**

On divise les antioxydants naturels en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme (Baba et al., 2008).

1- Antioxydant enzymatique :

L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les espèces réactives de l'oxygène (Morena et al., 2002) Les plus connues sont :

- **Le superoxydedismutase (SOD) :**

Localisés dans le cytoplasme, la mitochondrie et les milieux extracellulaires. , Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en oxygène. Selon la réaction suivant :



- **Catalase :**

Localiser dans la mitochondrie, le peroxysome et le cytoplasme. Elle est capable de transformé le peroxyde d'hydrogène, produit généralement par la SOD en eau et oxygène moléculaire.



- **Gluthion peroxydase (GPx) :**

Le glutathion (GSH, figure II.2) est un antioxydant abondant dans l'organisme où il joue un rôle de protection des tissus et de protéines (comme l'hémoglobine, la ferrine ou l'albumine) (Dringen et al., 2000). Il est principalement fourni par l'alimentation même si l'organisme est aussi capable d'en produire. Sous l'action de la glutathion peroxydase (Gpx), il réagit avec H₂O₂, ONOO⁻ et RO₂[•] (Lehucher-Michel et al., 2001, Bartesaghi et al., 2004) et forme du glutathion oxydé (GSSG, figure II.3).



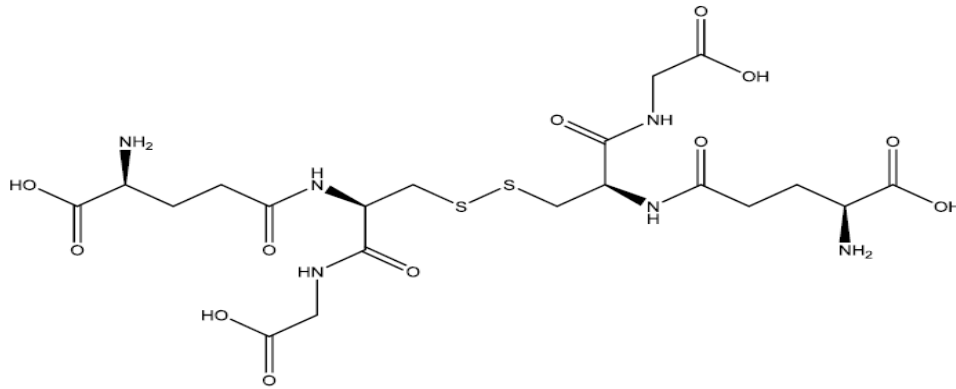


Figure II .2 : Formule du GSSG

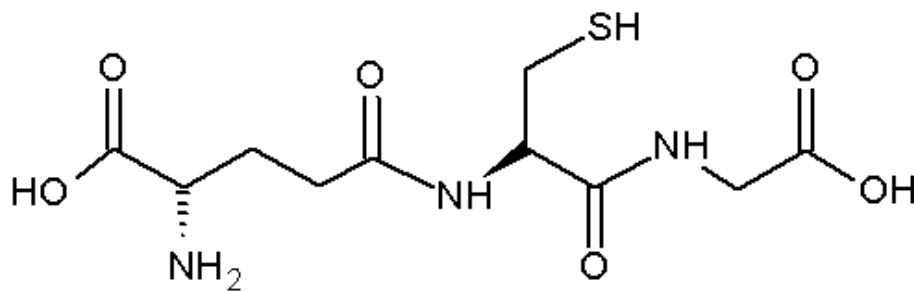


Figure II.3 : Formule de GSH

2-antioxydant non enzymatique :

- **La vitamine E :**

C'est un terme qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α , β , γ , δ) ou tocols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. C'est l' α tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. Plus de 50% de la vitamine E se trouvent dans les tissus adipeux (Papas, 2008; Yang et McClements, 2013).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (El-Sohemy et al., 2002).

- **La vitamine C :**

Qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion super oxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\bullet) l'oxygène singulier et réduit le peroxyde

d'hydrogène en eau, elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E (Orban, 2011 ; Favier, 1997)

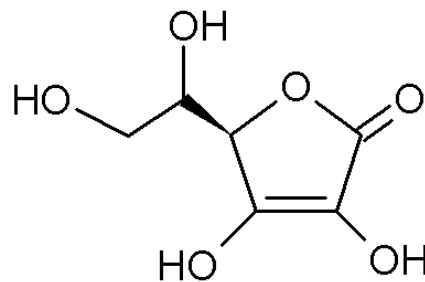


Figure II.3 : Formule de la vitamine C

- **Les caroténoïdes :**

Les caroténoïdes sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH^\bullet et peroxydes RO^\bullet . Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Les caroténoïdes peuvent aussi capter l'oxygène singulier, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets (Gardès-Albert et *al.*, 2003). Il existe plusieurs membres dans le groupe des caroténoïdes, mais le caroténoïde le plus connu et étudié est le β -carotène, qui est un puissant antioxydant capable d'éteindre rapidement l'oxygène singulier (Fusco et *al.*, 2007).

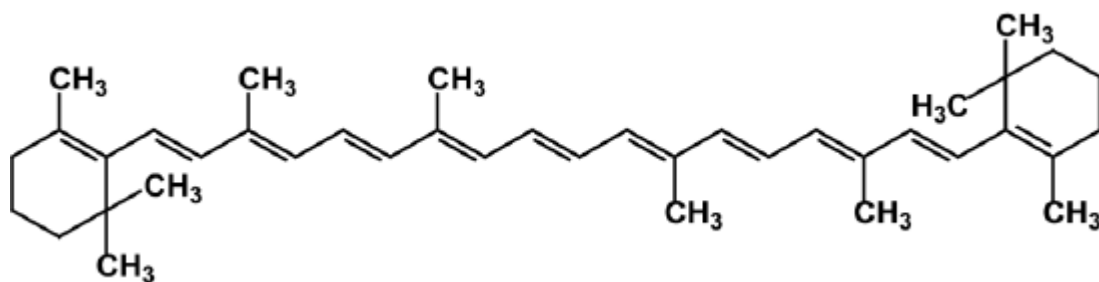


Figure II.4 : Structure de la β -carotène.

- **Les polyphénols :**

Les polyphénols sont des substances chimiques ayant au moins un cycle aromatique portant une ou plusieurs fonctions OH. Ils présentent une activité antioxydante importante, bien plus élevée que la vitamine E. Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulier $^1\text{O}_2$ et le radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ en le dismutant en H_2O_2 (E. Haslam, 1996 ; A. Moure et *al.*, 2001 ; L. Chen et *al.*, 2003).

- **Les flavonoïdes :**

Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres, comme O_2^{\bullet} , le OH^{\bullet} , pyroxyde et alotoxyde, par transfère de l'hydrogène (Orban, 2011 ; Favier, 1997).

- **Les oligo-éléments :**

Les oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse (Pastre, 2005).

- **Le zinc (Zn) :**

Le Zinc est un oligo-élément de numéro atomique 30 et de masse atomique 66,39 (Mader, 2010). Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Le zinc protège les groupements thiols des protéines et il peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre. La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. (Mezzetti et al., 1998).

- **Le sélénium (Se) :**

Le sélénium est un oligo-élément de numéro atomique 34 et de masse atomique 78,96 (Reilly, 2006). C'est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire (Wolters et al., 2005).

II.2.2.2- Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu et al., 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques.

Chapitre III

*L'extraction assistée par
ultrasons*

L'extraction assistée par Ultrasons (EAU) est très efficace en terme de temps énergétique en terme d'économie, en terme de rendement et en terme de pureté du produit final (Bayar et al., 2017; Chemat et al., 2017). Le procédé d'extraction est réalisé grâce à un appareil appelé sonicateur qui permet de transformer l'énergie électrique en vibration mécanique longitudinale le long d'une sonde, cette dernière permet de détruire les cellules biologiques en suspension (Prommajak et al., 2014).

III.1- Définition :

Les ultrasons sont des ondes vibratoires acoustiques ayant des fréquences allant de 16 kHz à 1010 kHz. Ils sont donc à l'origine de sons inaudibles pour l'humain, car leurs fréquences sont en majorité supérieures au seuil d'audibilité de notre oreille (0.02 kHz à 20 kHz) (Gazanhe et Jessel, 1970; Pétrier *et al.*, 2008; Société Française d'Acoustique, 2010). En fonction de leur fréquence, le domaine d'application des ultrasons diffère (Figure III.1). L'appareil à ultrasons utilisé pour l'extraction génère des ultrasons de puissance (20 kHz). Dans cette catégorie, deux niveaux sont distingués : ceux de basses fréquences, allant de 16 à 100 kHz, et ceux de hautes fréquences, allant de 100 kHz à 1000 kHz (Chemat, 2014). En milieu solide, les ultrasons de puissance vont produire des échauffements et une vibration du milieu, alors qu'en milieu liquide, ils produiront essentiellement un phénomène de cavitation (Société Française d'Acoustique, 2010; Chemat, 2014).

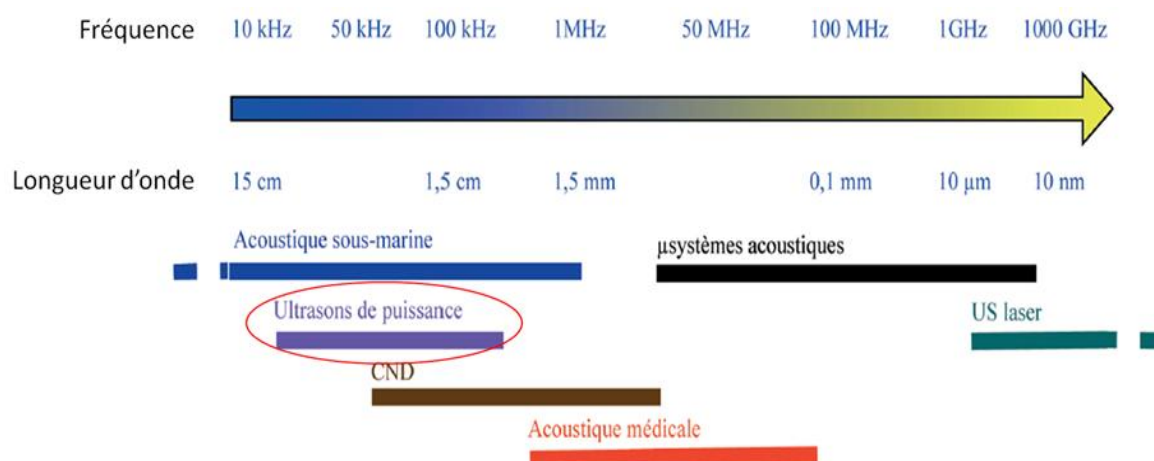


Figure III.1 : Exemple de domaine d'application des ultrasons en fonction de la fréquence et de la longueur d'onde (Société Française d'Acoustique, 2010).

III.2- Principe de l'extraction par ultrason :

L'extraction assistée par Ultrasons est une technique dans laquelle l'énergie acoustique et les solvants sont appliqués pour extraire des composés cibles de diverses matrices végétales (Chemat and Khan, 2011).

Lorsque les solvants sont soniqués, des ondes sonores de haute intensité sont transmises à travers le milieu liquide, ce qui entraîne des cycles alternés de compression et de décompression, qui à leur tour entraînent des changements de pression, donnant lieu à un phénomène appelé cavitation (Figure III.2) : Ce phénomène se produit lorsque de petites bulles se forment, ces derniers arrivant à un stade donné ne peuvent plus absorber de l'énergie et s'effondrent violemment, produisant un échauffement local intense, des pressions élevées et des forces de cisaillement qui entraînent des courants de micro-projection vers la surface solide, engendrant des effets tels que l'érosion et la dégradation des particules (Chemat et al., 2017).

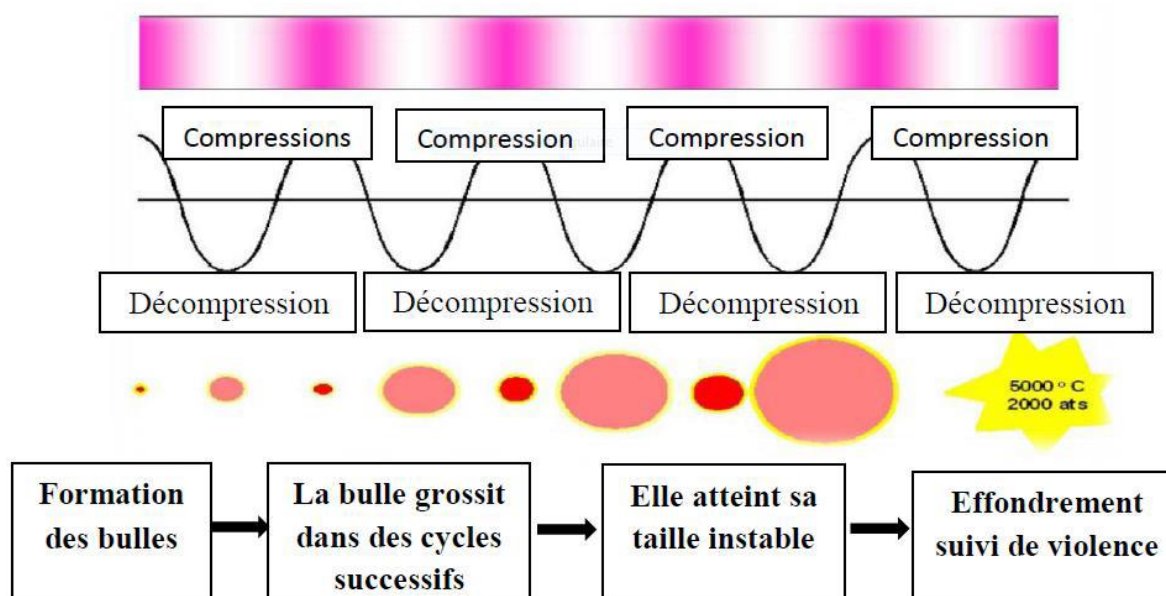


Figure III.2 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore (Mason and Lorimer, 2002)

Ce processus génère l'énergie nécessaire pour créer un effet chimique et mécanique qui favorise la libération des composés solubles du tissu végétal brut par la rupture de la paroi cellulaire, améliorant le transfert de masse et facilitant la pénétration du solvant et la libération des bio composants désirés dans le milieu d'extraction (Sanchez-Madrigal et al., 2017).

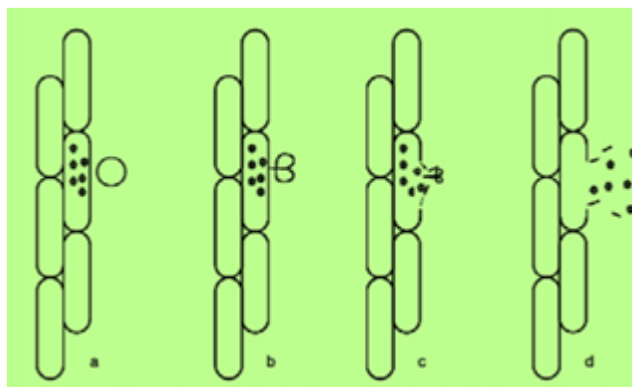


Figure III.3 : Impact de l'implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'une cellule végétale.

III.3- Paramètres influençant la cavitation :

La formation des bulles (cavitation) est influencée par plusieurs paramètres, ceux qui sont propres à l'onde (amplitude, intensité, le rapport de puissance, la fréquence et la longueur d'onde, la température), la viscosité de la solution, le temps de traitement, la pression intérieure du milieu ainsi la présence d'impuretés et/ou de gaz dissout... (Saletes et al., 2011).

III.3.1- Température :

Les températures élevées du solvant améliorent la diffusion des solutés de la matrice dans le milieu d'extraction et les températures basses, augmentent la cavitation par conséquent l'équilibre entre la diffusion et la cavitation doit être atteint (Flórez-Fernández and Muñoz, 2018).

III.3.2- Amplitude :

L'intensité ultrasonique est un paramètre qui est directement corrélé à l'amplitude du transducteur et par conséquent à l'amplitude de pression de l'onde sonore (Capelo-Martínez, 2009). Avec l'augmentation dans l'amplitude de la pression, l'effondrement des bulles sera plus violent. En ce qui concerne l'extraction, la détermination de l'intensité ultrasonique (IU) est une valeur d'entrée pertinente ayant un impact important sur l'efficacité de l'extraction. (Mason and Lorimer, 2002).

III.3.3- Temps :

En général le temps de contact entre les deux phases est un paramètre très important à maîtriser. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter le temps d'extraction lorsque le

rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au-delà, ainsi des économies d'énergie et de man d'œuvre seront réalisées (Galvan D'Alessandro, 2013)

III.4- Avantages de l'extraction par ultrason :

L'utilisation d'ultrasons comme méthode d'extraction présente plusieurs avantages : diminuer les temps d'extraction et les quantités de solvants utilisés, tout en augmentant les rendements d'extraction et en gardant une température basse dans le milieu (Chemat, 2014). Les molécules thermolabiles sont ainsi préservées (Ajila *et al.*, 2010). Elle peut être utilisée avec des échantillons solides ou liquides et pour extraire des composés organiques ou inorganiques. Dans le cas d'échantillons solides, ce type d'extraction peut notamment être utilisé dans un procédé en continu en récupérant le solvant au fur et à mesure de l'extraction (Rezic *et al.*, 2008). Il s'agit d'une méthode modifiée de macération où les ultrasons facilitent l'extraction des composés à solubiliser via la lyse de la paroi cellulaire. L'efficacité de ce procédé dépend de la fréquence et de l'amplitude des ultrasons. Plusieurs auteurs ont ainsi rapporté l'efficacité de cette méthode sur l'extraction de métabolites de plantes en augmentant notamment les rendements obtenus en fonction des solvants utilisés (Azmir *et al.*, 2013; Nait Sidi Ahmed, 2012).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre IV
Matériels et méthodes

- Extraction du mucilage :**VI.1.1- Matériel végétal :**

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est les graines de lin, *Linum usitatissimum L*, appelée localement «Zaria'at el ketan», Un échantillon commercial de lin brun est acheté chez un herboriste, nettoyé de tout déchets, stocké à température ambiante.



Figure IV.1: Les graines de lin.

IV.1.2- Procédure d'extraction et purification des polysaccharides :

Une masse des graines de lin est rincée à l'eau distillée, puis remis dans un volume de 15ml d'eau distillée. Le mélange est soumis par la suite à l'ultrason à des différentes intensités et pendant des temps déterminés. Après sonication, on procède à une filtration. L'éthanol à 95% (2 fois le volume du de l'eau) est ajouté au filtrat pour précipiter les mucilages ; le mélange est porté au vortex pendant quelque minute, puis Laissé au repos pendant 1h à 4°C. Après centrifugation de 15min à 1000rpm, les mucilages sont récupérés et séchés à l'étuve pendant 12h à une température de 45°C. Les mucilages recueillis sont pesés pour calculer le rendement par la formule suivante :

$$\text{Rendement(\%)} = \frac{\text{masse des mucilages obtenus}}{\text{masse des graines de lin}} \times 100 \text{ Formule (IV.1)}$$

IV .1.3- Plan d'expérience :

Le plan d'expérience utilisé pour la réalisation de ce travail s'inspire du modèle des plans de surface de réponse, ou plans de seconde degré (Goupy, 2006), c'est une méthode d'optimisation qui a pour principal but l'évaluation des relations pouvant exister entre les différentes réponses, ainsi que les facteurs appelés ($X_1 X_2 X_3$). Plusieurs plans sont employés pour l'analyse des résultats à savoir le plan Box-Behnken et le plan composite centré (Pengpeng, 2014). Dans notre travail nous avons utilisé le plan Box-Behnken, ce plan permet

d'entreprendre l'étude de facteurs, en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux, sans perdre le bénéfice des essais déjà effectués.

Les points expérimentaux du plan Box-Behnken sont représentés au milieu des arêtes de chacun des côtés d'un cube. C'est un plan qui peut comporter jusqu'à douze essais, auxquels on peut ajouter des points au centre. Un plan avec trois facteurs est illustré dans la figure suivante (Goupy, 2006) :

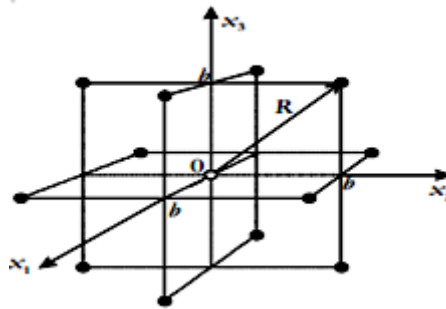


Figure IV.2 : Plan Box-Behnken pour trois facteurs.

La matrice est sous forme codée, ou chaque variable est convertie en une valeur codée selon l'équation suivante (Yetilmezsoy et al,2009) :

$$X = \frac{x_i - x_0}{\delta_x}$$

- X_i est la valeur codée de la variable ;
- x_i est la valeur réelle de la variable ;
- x_0 est la valeur du point central ;
- δ_x est la variation entre les niveaux haut et bas.

Pour traduire la variation des réponses expérimentales étudiées dans ce type de plan, nous utilisons le modèle mathématique suivant (Hasan et al, 2010) :

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

- y : réponse expérimentale ;
- X_i : variables codées (-1 ou +1) ;
- β_0 : estimation de l'effet moyen générale ;
- β_i : estimation de l'effet principale du facteur i pour la réponse y

- β_{ij} : estimation de l'effet d'interaction entre le facteur i et le facteur j pour la réponse y ;

- β_{ii} : estimation de l'effet quadratique du facteur i pour la réponse y .

L'ensemble des expériences est regroupé dans une matrice, généré par logiciel, JMP 9.0.2 (SAS Institute) (Tableau IV.1). Trois facteurs ont été étudiés, la masse des graines (X_1), temps de sonication (X_2) et puissance de sonicateur (X_3) (Tableau IV.2).

Tableau IV.1 : la matrice d'extraction.

Essai	Valeur codée		
	X_1	X_2	X_3
1	0	-1	-1
2	0	0	0
3	-1	0	1
4	1	0	-1
5	1	1	0
6	0	1	-1
7	0	0	0
8	-1	-1	0
9	1	0	1
10	0	1	1
11	1	-1	0
12	-1	0	-1
13	0	0	0
14	0	-1	1
15	-1	1	0

Tableau IV.2:Facteurs étudiés dans la matrice.

Facteurs	Symbole	Niveau		
		-1	0	+1
Masse(g)	X ₁	0,5	1,25	2
Temps (min)	X ₂	10	20	30
Puissance(%)	X ₃	20	60	100

IV.2- Caractérisation des mucilages :

IV.2.1- Caractérisation biochimique :

IV.2.1.1-Dosage des Sucre totaux :

➤ Principe :

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois et al., (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ Protocole :

Le dosage est réalisé à partir de 1ml de solution à doser auquel est ajouté 1ml de solution aqueuse de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique concentré à 80%. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont placés au bain-marie à 90°C pendant 5min. Les tubes sont ensuite conservés à l'obscurité 30 min pour refroidir le mélange avant lecture de l'absorbance de la solution au spectrophotomètre à 485nm. Le blanc est constitué de 0,5ml d'eau distillée auquel tous les réactifs du dosage ont été ajoutés. La lecture des tubes permet de réaliser une courbe d'étalon $DO(485\text{ nm}) = (f([\text{glucose}] \text{ mg/ml}))$.

IV.2.1.2- Dosage des protéines par la méthode de Bradford :**➤ Principe :**

C'est une méthode de dosage colorimétrique, qui utilise un colorant, le bleu de Coomassie G250, celui-ci s'associe au groupement amines des résidus protéiques, en modifiant son spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595 nm (Pelmont., 1993).

➤ Mode opératoire :**- Réalisation du courbe étalon :**

La gamme étalon est réalisée dans une série de tubes dans lesquels des volumes croissant (0-100 µl) de BSA à 0,1 % sont déposés et complétés à 100 µl de l'eau distillée. Chaque tube reçoit alors 3 ml de réactif de Bradford (fiche technique).

Le développement de la réaction chromogène se fait à l'obscurité, pendant 5 min. La lecture de ses tubes à 595 nm, permet de tracer la courbe d'étalon $DO(595\text{ nm}) = (f [\text{BSA}] \text{ mg/ml})$.

- Détermination de la concentration protéique :

La concentration de l'échantillon en protéine est déterminée après lecture à 595 nm et par extrapolation sur la courbe d'étalon.

IV.2.2- La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier :**➤ Principe :**

Le rayonnement infrarouge (IR) est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière visible mais plus courte que celle des microondes. L'analyse FTIR est une technique d'analyse permettant de caractériser les fonctions chimiques de composés organiques, inorganiques, cristallisés ou amorphes. Le principe consiste à exposer l'échantillon à des radiations infrarouges de différentes longueurs d'onde. Les molécules de l'échantillon peuvent absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques qui les constituent. L'intensité de lumière absorbée à chaque longueur d'onde est mesurée : on obtient alors un spectre caractéristique des différents groupements chimiques présents. La comparaison des spectres avec des composés de référence permet d'identifier certaines substances présentes (Salvant, 2012).

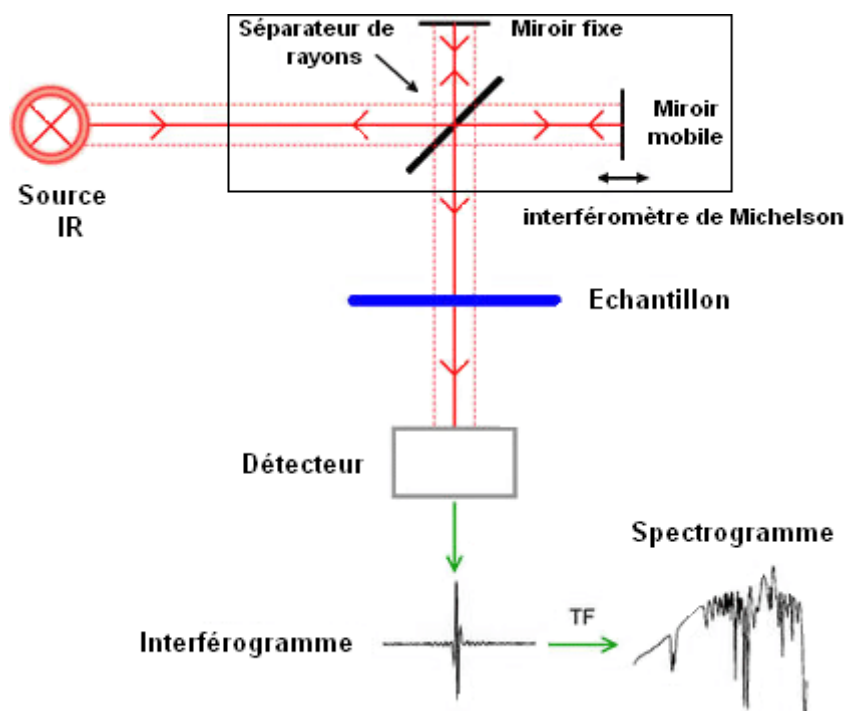


Figure IV.3: Principe de fonctionnement d'un spectromètre IR (Borella, 2006).

➤ **Protocole :**

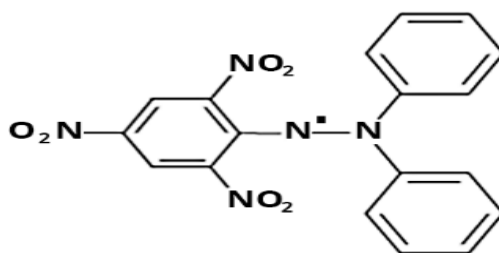
L'analyse a été réalisée avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type VERTEX 70 FT-IR. Le polysaccharide sec extrait des graines de lin est déposé sur un ATR A225 diamant. Les spectres IR (60 scans) ont été enregistrés à température ambiante avec une gamme de nombre d'onde allant de 500-4000 cm^{-1} . Les spectres ont été analysés avec le logiciel OPUS 7.2.

IV.3 Evaluation de l'activité antioxydante :

IV3.1- Test anti-radicalaire pour le dosage du DPPH :

➤ **Principe :**

Le DPPH (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil) (figure IV.3) est un radical libre stable de couleur violette intense, soluble dans du méthanol, fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Brand-Williams et al., 1995**).



FigureIV.4 Structure chimique de DPPH

La réduction du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 Diphényl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Molyneux, 2004).

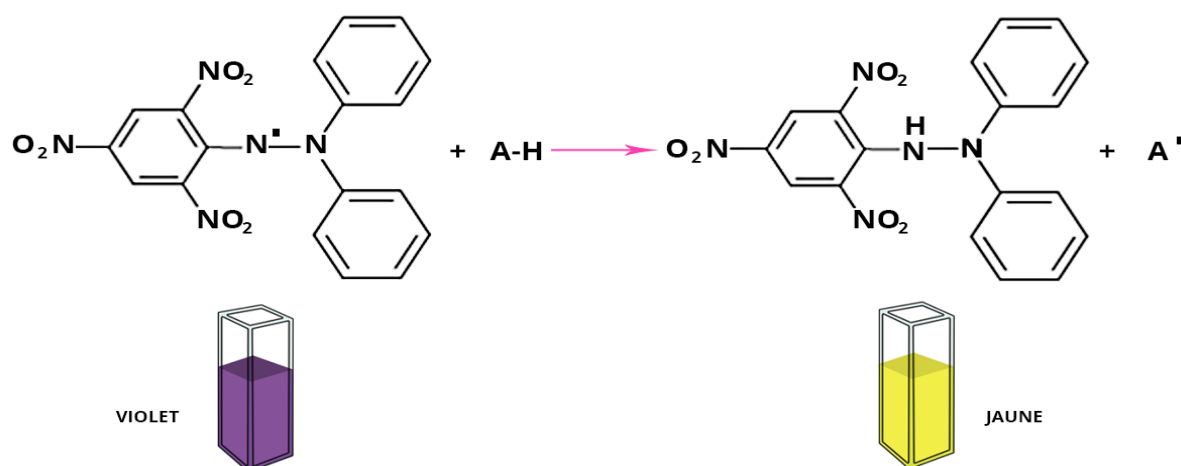


Figure IV.5 réaction de réduction du radical libre DPPH .

➤ **Protocole :**

2 ml de solution de DPPH dans l'éthanol et 2ml de solution de mucilage sont mélangés. Puis le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Les absorbances sont mesurées à 517nm.

Le pourcentage d'activité anti-radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition du radical DPPH}(\%) = \frac{(A_{\text{témoin}}) - (A_{\text{échantillon}})}{(A_{\text{témoin}})} \times 100 \quad \text{Formule (IV.2)}$$

Avec :

$A_{\text{échantillon}}$ = Absorbance à 517 nm du mélange (Mucilage + DPPH).

$A_{\text{témoin}}$ = Absorbance à 517 nm de la solution de DPPH (DPPH dans l'éthanol + l'eau distillée).

IV.3.2- Test antiradicalaire (radical hydroxyle OH) :

La mesure de l'activité anti-radicalaire (Hydroxyl radical) des polysaccharides issus des graines de lin a été réalisée selon un protocole adapté par **Delattre et al. (2015)**.

Les fractions polysaccharidiques étaient dissoutes à différentes concentrations (de 0 à 10 g/L) dans de l'eau distillée. Un volume de 2 mL de chaque solution a été mélangé avec 2 ml d'une solution de FeSO₄ (5 mM dans l'eau distillée). Après homogénéisation au vortex, 2 ml de H₂O₂ (1 % dans l'eau distillée) ont été ajoutés avant de mélanger la solution. Les mélanges ont été incubés à température ambiante (25 °C). Après 60 minutes d'incubation, 1 ml d'eau distillée était ajouté avant lecture de l'absorbance à 510 nm ($=A_{\text{échantillon}}$). Les dosages ont été réalisés en triplicata.

Le pourcentage d'activité anti-radical hydroxyle est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition du radical hydroxyl}(\%) = \frac{(A_{\text{témoin}}) - (A_{\text{échantillon}})}{(A_{\text{témoin}})} \times 100 \quad \text{Formule (IV.3)}$$

Avec :

$A_{\text{échantillon}}$ = Absorbance à 510 nm de la fraction polysaccharide à doser.

$A_{\text{témoin}}$ = Absorbance à 510 nm du mélange où l'échantillon à doser est remplacé par 0,2 ml d'eau distillée.

Chapitre V

Résultats et discussions

V.1- Extraction de mucilage :

Nous avons réalisé les extractions du mucilage à partir les graines de lin par ultrasons, en utilisant la matrice de plan d'expérience (X_1 : masse des graines ; X_2 : temps ; X_3 : puissance), afin d'améliorer le taux de mucilage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (tableau V.1) :

TableauV.1 : Résultat de taux de mucilage.

Essai	X_1	X_2	X_3	Taux de mucilage (%)
1	0	-1	-1	23,2
2	0	0	0	7,28
3	-1	0	1	24
4	1	0	-1	10,5
5	1	1	0	14,5
6	0	1	-1	15,2
7	0	0	0	7,84
8	-1	-1	0	14
9	1	0	1	28
10	0	1	1	38,4
11	1	-1	0	21,5
12	-1	0	-1	8
13	0	0	0	8,08
14	0	-1	1	16
	-1	1	0	22,16

D'après les résultats du tableau V.1, nous avons obtenu des rendements variants entre 7,28% et 38,4% en fonction des essais réalisés. Le plus faible rendement est observé pour les moyennes valeurs X_1 , X_2 et X_3 (0, 0 et 0). Le maximum rendement est obtenu lorsque les paramètres opératoires sont au niveau de (0, 1 et 1).

En termes de mucilage, les graines de *linum usitatissimums* ont riches en ce type de polysaccharides avec un rendement de 38,4%.

Les effets de chaque facteur (X_1 , X_2 , X_3) et les effets d'interaction sont déterminés par la méthode de moindre carrée à partir des résultats expérimentaux. Les coefficients de régression pour le modèle été présente dans le tableau V.2.

Tableau V.2 : Estimations des coefficients triés :

Terme	Coefficient	Effet	Erreur standard
Constante	7,7333333	7,7333333	0,639529
linéarité			
X_1	-0,1075	-0,215	0,39163
X_2	1,045	2,09	0,39163
X_3	6,1875	12,375	0,39163
Interaction			
$X_1 * X_2$	-3,79	-7,58	0,553849
$X_1 * X_3$	2,175	4,35	0,553849
$X_2 * X_3$	9,4	18,8	0,553849
Quadratique			
X_1^2	4,1658333	4,1658333	0,576464
X_2^2	6,1408333	12,2816666	0,576464
X_3^3	7,5258333	15,0516666	0,576464

A partir des valeurs des coefficients, le modèle mathématique de second degré peut être donné pour la réponse étudiée comme suit :

$$Y \text{ (taux de mucilage)} = 7,73 - 0,11X_1 + 1,05X_2 + 6,19 X_3 - 3,79X_1X_2 + 2,18X_1X_3 + 9,4X_2X_3 + 4,17X_1^2 + 6,14X_2^2 + 7,53X_3^2$$

Nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que le facteur linéaire X_1 (masse) exerce un effet négatif sur le taux du mucilage, or que les facteurs X_2 (temps) et X_3 (puissance) exercent un effet positif. Les effets d'interaction des facteurs X_1X_3 et X_2X_3 et les effets quadratiques X_1^2 , X_2^2 et X_3^2 exercent un effet positif alors que l'interaction de facteur X_1X_2 entraîne un effet négatif sur la réponse.

Nous pouvons conclure que le signe positif qui accompagne les effets traduit une augmentation du taux de mucilage lorsqu'on passe des niveaux bas vers les niveaux hauts, et le signe moins traduit une diminution de la réponse lors du passage des niveaux bas vers les niveaux hauts.

Après estimation des effets moyens des facteurs, nous avons étudié la significativité des facteurs moyennant l'analyse de la variance. Cette analyse comporte les paramètres statistiques suivants : somme des carrés, degré de liberté, carré moyen, statistique de Fisher et la probabilité.

Tableau V.3 : Analyse de la variance concernant le taux du mucilage.

Source	Sc	Ddl	CM	F°	P
Modèle	1106,9380	9	122,993	100,2394	<0,0001*
Manque d'ajustement	5,7979000	3	1,93263	11,4674	0,0813
Linéarité					
X_1	0,042	1	0,042	-0,27	0,7947
X_2	8,43	1	8,43	2,67	0,0444*
X_3	16,307	1	16,307	15,80	<0,0001*
Interaction					
$X_1 * X_2$	0,0251	1	0,0251	-6,84	0,0010*

$X_1 * X_3$	0,0482	1	0,0482	3,93	0,0111*
$X_2 * X_3$	0,112	1	0,112	16,97	<0,0001*
Quadratique					
X_1^2	0,578	1	0,578	7,23	0,0008*
X_2^2	0,488	1	0,488	10,65	0,0001*
X_3^2	0,003	1	0,003	13,06	<0,0001*
Résidu	6,135	5	1,227		
Totale	1113,073	14			
$R^2 = 0,994488$					
$R^2_{aju} = 0,984567$					

Nous constatons que le modèle postulé est significatif. En effet, la probabilité associée au modèle est inférieure à 0,05. Ceci indique que les variations de la réponse sont expliquées par l'équation de régression.

Nous notons aussi des valeurs élevées des coefficients de corrélations R^2 et R^2_{aju} , qui sont respectivement de 0,99 et 0,98 ; valeurs proches de l'unité. Ceci traduit une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V.1).

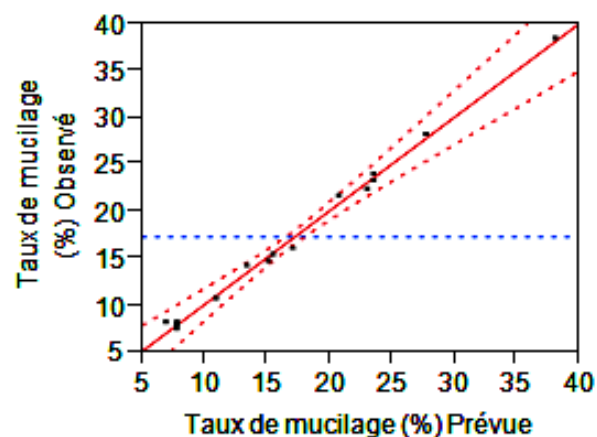


Figure V.1 : Taux de mucilage (valeurs observées) en fonction des valeurs prédites.

Le manque d'ajustement, est l'écart systématique entre le modèle réel et le modèle postulé. La probabilité associée à ce dernier est supérieure à 0,05, elle est de 0,081. Ce qui signifie que la variance due au manque d'ajustement est non significative, validant ainsi le modèle.

L'analyse de la variance des facteurs montre que le facteur X_1 n'a aucun effet statistique significatif car la probabilité calculée pour ce facteur est supérieure à 0,05. Les autres facteurs présentent une faible valeur de probabilité ($P < 0,05$) ; ce qui indique l'impact et l'influence que possède ces facteurs sur le taux de mucilage.

De tous ces résultats, il apparaît que le modèle postulé permet une exploitation et une détermination des conditions optimales de l'extraction du mucilage à partir des graines de lin. En effet les conditions optimales qui permettent d'obtenir le taux le plus élevé d'extraction (38,4 %), masse des graines, temps d'extraction et puissance, sont comme suit : 1,25 g, 30min et 100%.

V.2- Caractérisation du mucilage :

V.2.1- Caractérisation biochimique :

V.2.1.1- Dosage des sucres totaux :

Pour déterminer la concentration en glucose présent dans le mucilage extrait, il faut établir une courbe d'étalonnage selon la méthode de Dubois (1956) (figure V.2).

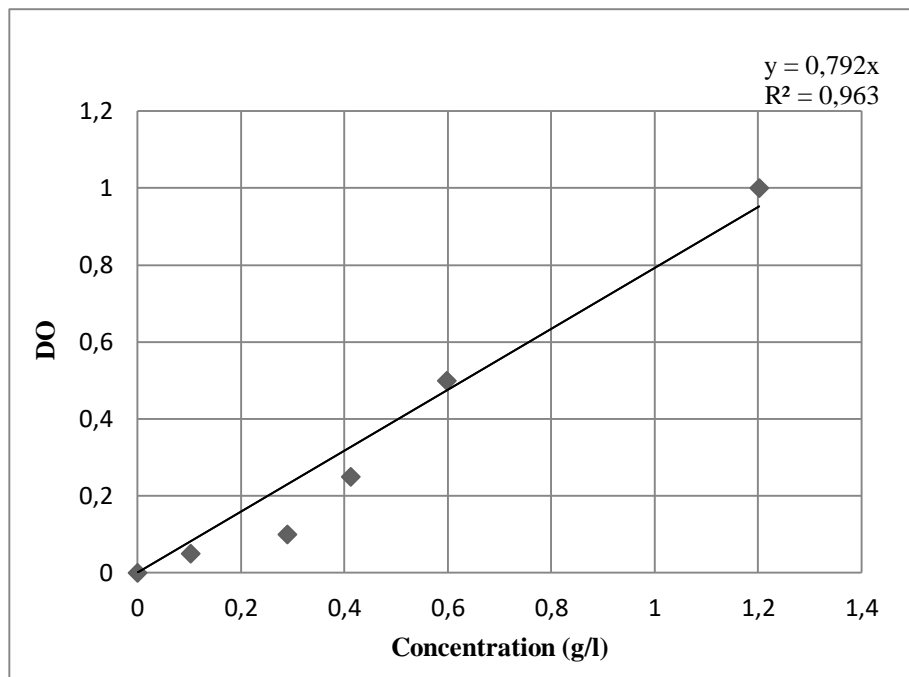


Figure V.2 : Courbe d'étalonnage des sucres totaux.

D'après cette courbe d'étalonnage en glucose, en parallèle on a dosé la concentration en sucre totaux de mucilage. Les résultats sont illustrés dans le tableau V.4.

Tableau V.4 : Concentration du mucilage à doser.

	[Mucilage]	[Glucose]	[Glucose]/ [Mucilage]
Concentration (g/l)	0,1	0,08	0,8

Le rapport massique entre les sucres totaux et le mucilage est de 0,8 équivalent glucose g/l. La teneur en glucose de l'extrait polysaccharidique est de 80%. L'analyse biochimique des polysaccharides extrait des graines de lin a montré que les sucres sont les principaux constituants du mucilage.

V.2.1.2- Dosage des protéines :

Pour déterminer la concentration en protéine présents dans les mucilages extraits, il faut établir un courbe étalon selon la méthode de Bradford (figureV.3).

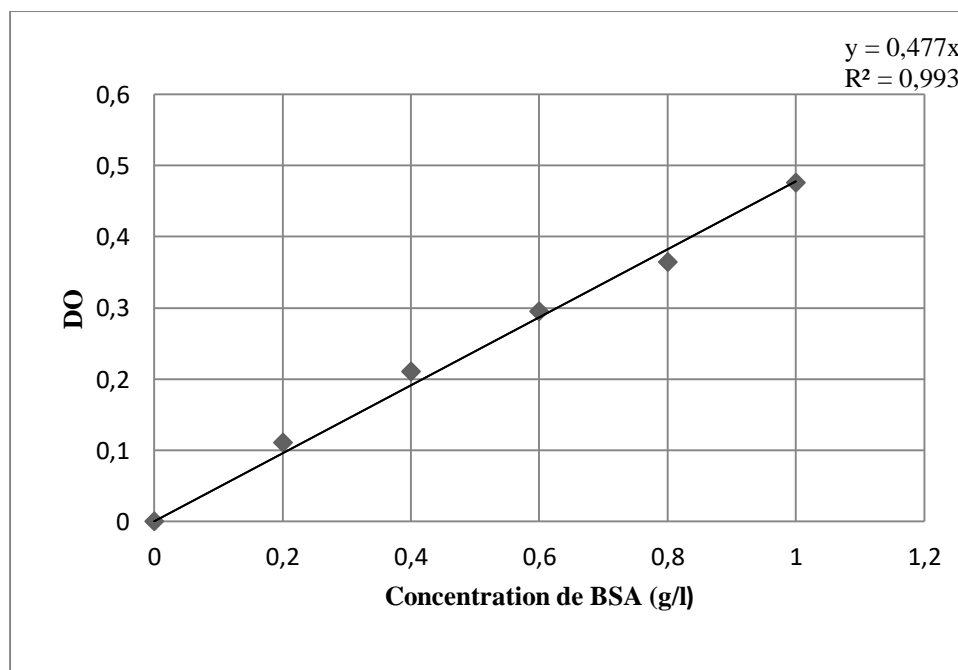


Figure V.3 : Courbe d'étalonnage en protéine BSA.

D'après cette courbe d'étalonnage en protéine BSA, en parallèle on a dosé la concentration en protéine de mucilage. Les résultats sont illustrés dans le tableau V.5.

Tableau V.5 : Concentration du mucilage à doser.

	[Mucilage]	[BSA]	[BSA]/ [Mucilage]
Concentration (g/l)	10	0,71	0,071

Le rapport massique entre la protéine BSA et le mucilage est de 0,071g/l. La teneur en protéines est de 7,1%, le dosage de protéine des polysaccharides extrait des graines de lin a montré que les protéines présentent en faible quantité dans le mucilage.

V.2.3- Analyse des mucilages par la FTIR:

L'analyse Infra-Rouge à transformée de Fourier (IR-TF) du polysaccharide extrait des graines de lin a permis de révéler de manière qualitative, la présence de groupes fonctionnels caractéristiques (figure V.4, tableau V.4).

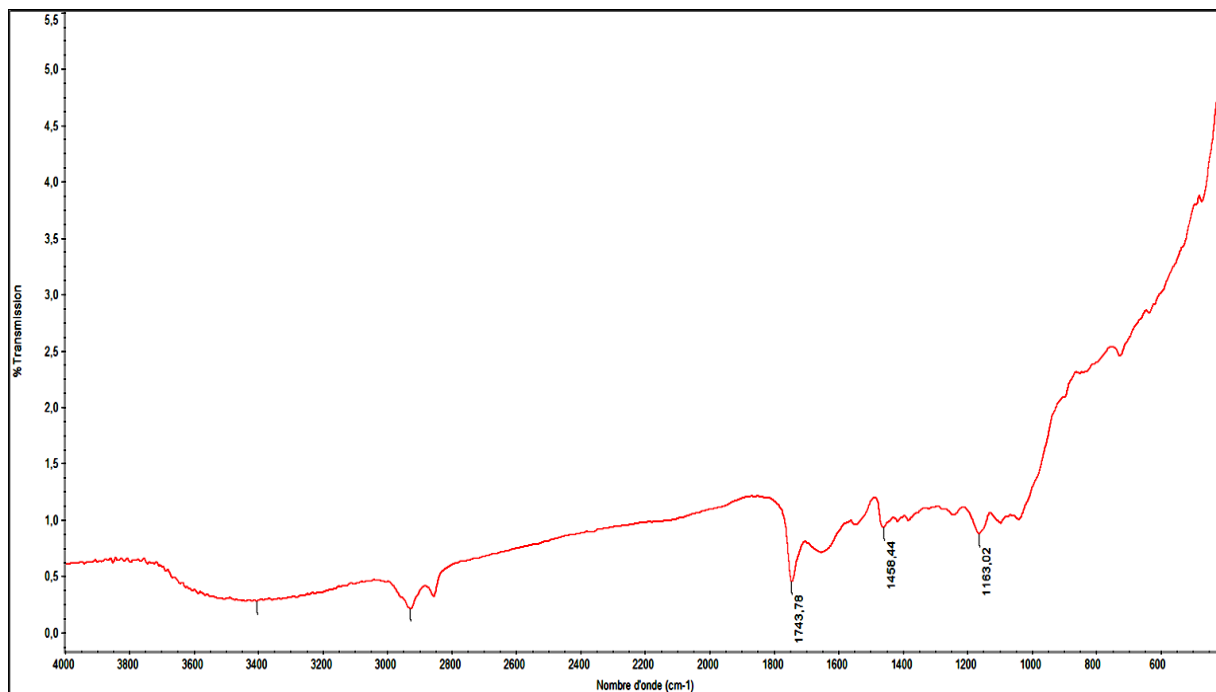


Figure V.4 : Spectre IR-TF du polysaccharide extrait des graines de lin.

La présence d'une large bande intense entre 3200-3500 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation des groupements hydroxyles (-OH) caractéristique des polysaccharides ainsi qu'à l'absorption de l'eau (Adel et al., 2010). De faibles bandes de vibrations asymétriques des liaisons C-H sont observées entre 2800 et 3000 cm^{-1} (Brian-Jaisson. 2014). De plus, les signaux à 1743,38 mettent en évidence la présence de groupe acétyle. Finalement, les bandes observées entre 900 et 1200 cm^{-1} et plus précisément celles obtenues à 1163,02 cm^{-1} , sont spécifiques des vibrations des liaisons C-O-C et C-O-H des structures polysaccharidiques (Schmitt et Flemming, 1998 ; Edwards et al., 1998).

Tableau V.4 : Principales bandes caractéristiques des groupes fonctionnels des polysaccharides extraits de mucilage des graines de lin analysés par spectroscopie Infra-Rouge.

Longueur d'onde (cm^{-1})	Liaison	Groupe	Vibration	Intensité
3403,80	O-H	Phénols	Elongation	Forte et large
2926,86	C-H	Alcanes	Elongation asymétrique	Forte
1743,38	C=O	Acétyles	Elongation	Forte
1458,44	COO ⁻	Carboxylates	Elongation	Variable
1163,02	C-O	Alcools	Elongation	Variable

V.3- Evaluation de l'activité antioxydante :

V3.1- Activité anti-radicalaire du DPPH :

Le pouvoir antioxydant de mucilage extrait des graines de lina été évalué par le dosage de l'activité anti-radical DPPH (Figure V.5). Le test anti-radical DPPH est sans conteste la principale méthode utilisée pour évaluer le pouvoir de réduction des radicaux libres par des molécules anti-oxydantes (Delattre et al, 2014 ; Elboutachfaitiet al., 2011).

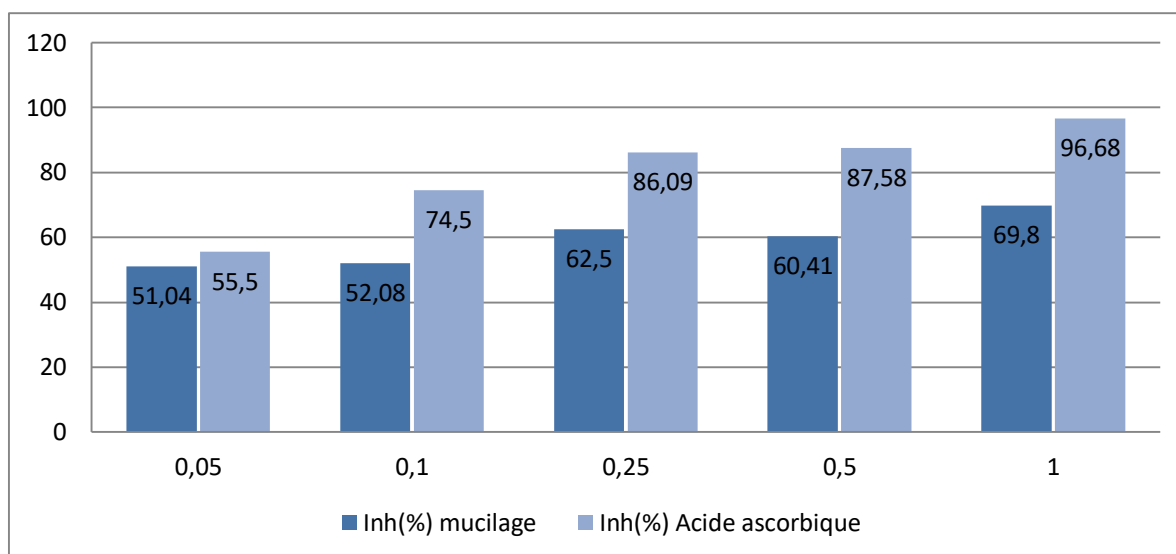


Figure V.5 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH(%).

Comme observé sur la figure V.5, pour chaque concentration testée, le mucilage extrait des graines de lin présente une activité anti-oxydante vis-à-vis des radicaux DPPH. Cependant les concentrations testées (de 0,05 à 1 g/l) des solutions de mucilage ont des activités anti-radicalaires inférieures à celles des solutions de l'acide ascorbique (antioxydant naturel standard). Les échantillons du mucilage plus concentrés possèdent des activités inhibitrices plus élevées que celles de faible concentration.

Le mucilage extrait montre une activité anti-radicalaire significative qui correspond à 69,8% pour la concentration de 1 g/l.

V.3.2- Test anti-radical hydroxyleOH :

Le pouvoir antioxydant du mucilage extrait des graines de lin a été évalué par le dosage de l'activité anti-radicalaire hydroxyle (figure V.6) :

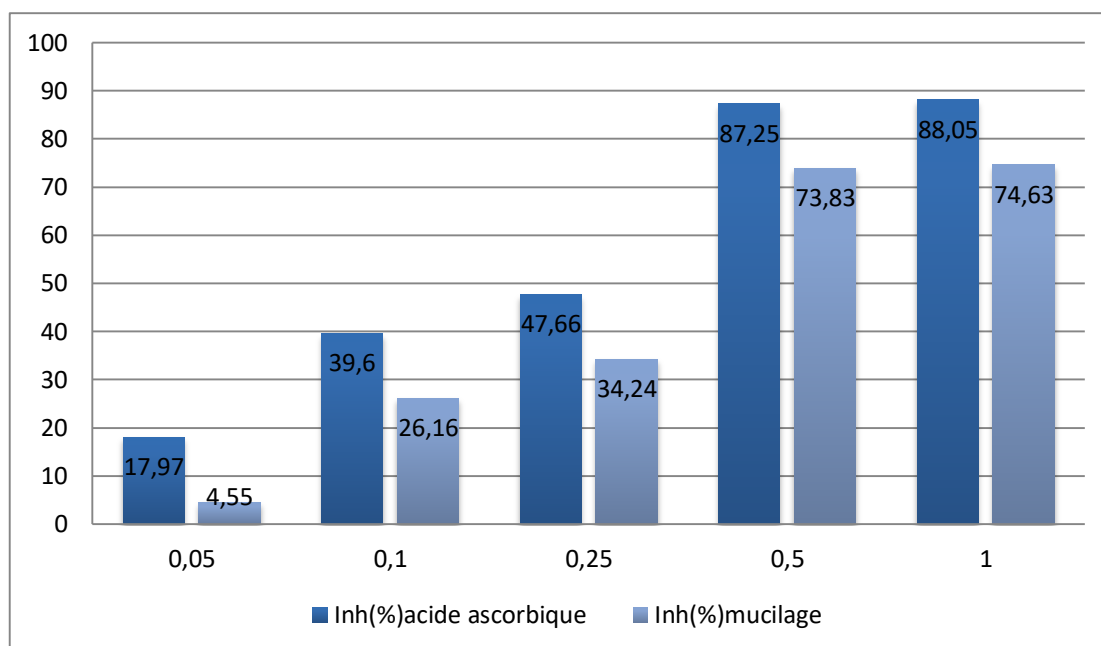


Figure V.6 : Inhibition de radical hydroxyle

La figure V.6 montre les différents pourcentages d'inhibition de l'extrait des graines de lin qui varient entre 4,55 et 74,63 %. Le mucilage a exhibé une activité inhibitrice significative allant jusqu'à 74,63% pour les concentrations les plus élevées (0,5 et 1 g/l).

En fonction des résultats obtenus nous pouvons conclure que le mucilage extrait des graines de lin possède une activité anti-oxydante importante pour les grandes concentrations du mucilage, et ça revient au composé phénolique présent dans le mucilage.

Conclusion générale

Conclusion générale:

L'extraction du biopolymère, mucilage, à partir des graines de lin a été réalisée afin de tester son activité antioxydante et la comparer avec celle d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique. Le travail expérimental a été divisé en deux parties :

- Extraction du mucilage avec une optimisation des paramètres opératoires.
- Test de l'activité antioxydante en utilisant le mucilage comme antioxydant.

L'ensemble des résultats obtenus a été sélectionné pour dégager des conclusions :

- Etape d'extraction :

L'extraction du mucilage a été réalisée par sonication des graines de lin dans l'eau distillée, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Différents facteurs, rapport masse graine /volume d'eau, temps et puissance, ont été évalués pour optimiser les rendements d'extraction.

Les résultats obtenus indiquent des rendements compris entre 7.28 et 38.4 %. La modélisation de l'extraction a permis d'apprécier l'effet individuel et d'interaction que joue chaque facteur. Les conditions optimales d'extraction du mucilage sont : masse (1.25g), temps d'extraction (30 min) et puissance 100%. Sous ces conditions la réponse prédite optimale est de 38.4%.

L'analyse biochimique du mucilage a révélé une importante teneur en sucre 80% avec une faible teneur en protéine 7.1%, ce qui signifie que le mucilage extrait des graines de lin est riche en sucre. L'analyse infrarouge appliquée sur l'échantillon a montré des bandes caractéristiques, qui identifient les différentes fonctions chimiques contenues dans le mucilage extrait. Ce dernier contient des phénols, alcanes, acétyles, carboxylates et alcools.

- Etape d'évaluation de l'activité antioxydante :

Deux méthodes ont été suivies pour déterminer l'activité antioxydante du mucilage extrait des graines de lin:

L'effet piègeur du radical DPPH et le test anti-radicalaire hydroxyle.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire contre le radical DPPH à des concentrations différentes a prouvé que le mucilage extrait de graines de lin possède une bonne activité scavenger allant jusqu'à 69,8% pour la concentration de 1g/l.

Pour l'évaluation de l'activité anti radicalaire contre le radical OH, le mucilage possède un pourcentage d'inhibition important allant jusqu'à 74.63% pour la concentration de 1g/l.

Concernant les activités antioxydantes de mucilage, même si des activités anti-radicalaires ont clairement été identifiées notamment contre le DPPH, celles-ci se sont révélées assez faibles contre les radicaux hydroxyles même à des fortes concentrations de polysaccharides.

Enfin, les résultats obtenus dans ce mémoire permettent d'envisager des perspectives pour des études futures :

- Augmentation de taux d'extraction du mucilage en améliorant les conditions et les techniques d'extraction.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adel A.M., Abdel-Wahab Z.H., Ibrahim A.A., Al-Shemy M.T., Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials, Part I. Acid catalyzed hydrolysis. *Bioresource Technology* 101 : 4446 – 4455. (2010).
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., S. Godbout, S., Valéro, J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, volume 31, numéro 3, p. 227–249 (2010).
- Anonymous Contractual analyses Flax Council of Canada, Winnipeg, MB (1997).
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N, Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, volume 17, p. 426-436. (2013).
- Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21 (2003).
- Basharatyzed, Lepouvoir antioxydant des additifs phytogéniques. BIOMIN Holding GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg, AUSTRIA (2015).
- Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A., Kammoun, R., Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry* 235, 275-282. (2017).
- Bekhit, A. E. D., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Mohamed Ahmed, I. A., ... Bekhitf, A. A. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13 : 129-152. (2017).
- Bernacchia R., Preti R., Vinci G. Chemical composition and health benefits of flaxseed. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, 2: 1045 (2014).
- Bhatta, R. S. (Nutritional composition of whole flaxseed and flaxseed meal. In S. C. 1995).
- Both S., Chemat F., Strube J. Extraction of Polyphenols from Black Tea Conventional and Ultrasound Assisted Extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 1030-1034. (2014).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. et Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*, 28:25–30 (1995).
- Brian-Jaisson F., Ortalo-Magné A., Guentas-Dombrowsky L., Armougom F., Blache Y., Molmeret M., Identification of bacterial strains isolated from the

Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbial Ecology* 68 (1) : 94-110. (2014.).

- Bruneton, J.; Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris (2009).
- BRUNETON J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4ème édition de médicales internationales (Tec et Doc), Paris: 1288. (2009).
- Brunten, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 5ème édition, (Lavoisier) (2016).
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M.,. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 41, 357-377. (2017).
- Chemat, F. Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, 322 p., p. 1-26 et 91-117. (2014).
- Chemat F., Huma Z.E., Khan M.K. Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835. (2011).
- Chemat, F., Khan, M.K.,. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 813-835. (2011).
- Capelo-Martínez, J.-L., 2009. *Ultrasound in chemistry: analytical applications*. John Wiley & Sons.
- Casa R, Russell G, Cascio B. L, Rossini F. 1999. Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities. *European journal of agronomy*, 11(3), 267-278.
- Daun, J., Barthet, V., Chornick, T., Duguid, S. (2003) Structure, composition, and variety development of flaxseed. *dans: Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition*. Eds Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, pp 1-40
- Dringen, J. M. Gutterer, J. Hirrlinger, "Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species", *European Journal of Biochemistry*, Vol. 267, 2000, p. 4912.
- Diederichsen A, Richards K. 2003. Cultivated flax and the genus *Linum* L. *Flax: the genus Linum*, p32-38.
- Daun, J. K., & Przybylski, R. (2000). Environmental effects on the composition of four Canadian flax cultivars. *Proceedings of the 58th flax institute of the United States* (pp.80-91). Fargo : North Dakota.

- Day A., Ruel K., Neutelings G., Cronier D., David H., Hawkins S. & Chabbert B. Lignification in the flax stem : evidence for unusual lignin in bast fibers. *planta*. 222 : 234-245 (2005).
- Delattre C., Pierre G., Gardarin C., Traikia M., Elboutachfai R., Isogai A., Michaud P., 2014. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate Polymers* 116 : 34-41.
- E. Haslam, "Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action", *Journal of Natural Products*, Vol. 59, 1996, p. 205.
- Elicoch-Middlton, Jr., Chithan, K., Theoharis, C. Effect of plant flavonoids on mammalia, cells : implications for inflammation, heat diseases and. *Pharma Exper Therap*, 4(52) : 673-751 (2000).
- El-Sohemy, A. Baylin, A. Spiegelman, D. Ascherio, A. Campos, H. (2002). Dietary and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infarction. *Epidemiology*, Vol 13; Issue 2, pp. 216-223.
- Elboutachfai R., Petit E., Pillon M., Courtois B., Courtois J., Delattre C., Evaluation of antioxidant capacity of fulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan xopolysaccharide. *Food Chemistry* 127 : 976-983. (2011).
- Edwards H.G.M., Falk M.J., Sibley M.G., Alvarez-Benedi J., Rull F., FT-Raman spectroscopy of gums of technological significance. *Spectrochimica Acta* 54 : 903-909. (1998).
- Favier, A. Stress Oxydant et pathologies humaines, *Annals of Pharmacotherapy SAGE Journal*, Vol 64, pp. 390-396 (2006).
- Favier, A. Stress oxydant : Stress oxydant et pathologies humaines. Département de biologie intégrée du Chu de Grenoble, F 38700 La Tronche, et SCIB-LAN Centre nucléaire de Grenoble, F 38054 Grenoble, 64 : 390-396 (1997).
- Flórez-Fernández, N., Muñoz, M.J.G.,. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Carbohydrates, *Water Extraction of Bioactive Compounds*. Elsevier, pp. 317-331. (2018).
- Fusco, D, G. Colloca, M.R.L. Monaco, M. Cesari Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging*, 2 (3) , pp. 377-387 (2007).
- Galvan D'Alessandro, L.,. Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits. *Lille 1*. (2013).
- Gardés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. and Jore D. Espèces réactives d'oxygène: comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actuaitél Chimique*: 91-96 (2003).

- Gazanhes, C. et Jessel, M. Ultrasons. Dans Techniques de l'ingénieur –Archives électroniques, référence : e2690. (1970).
- Goupy, J, Creighton, L. Introduction aux plans d'expérience, 3^eédition, Dunod(2006).
- Greenwald, P., Clifford, C.K., and Milner, J.A. Diet and cancer prevention. *Eur. J. cancer* 37, 948-965.
- Gros, C. Extraction aqueuse et athermique de l'huile de lin assistée par décharges électriques de haute tension. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, pp 244. (2005).
- Gutowski M. and Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1) ; 1-16. (2013).
- HELLAL Z., Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. (2011).
- HoC, Cacace J, Mazza G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flax seed meal with pressurized low polarity water. *LWT-Food Sci Technol.* ; 40: 1637-1647. (2007).
- Halliwell B. et M. Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142, 231-255 (2004).
- Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports* 11:41-66 (1994).
- Izydorczyk K, Tarczynska M, Jurczak T, Mrowczynski J, Zalewski M Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environ Toxicol* 20: 425–430 (2005).
- Jean-Marc, Alban Muller, l'expert du naturel 28 Mars 2018.
- Kadivar, M. Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from Solin (low linolenic acid flax). PhD, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, pp 177. (2001).
- Krajčova A.; Schulzova V.; Hajšlova J.; Bjelkova M. (2009) . Lignans in Flaxseed. *Czech. J. Food Sci.* 27, 252-255 (2011).
- L. Chen, X. Yang, H. Jiao, B. Zhao, "Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells", *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 16, p. 1155, (2003).

- Lisu W, Jui-Hung Y, Hsiao-Ling L, Ming-Jiuan W. Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbonucifeca*Gertn). *Journal of food and druganalysis*, 11(1), 60-66, (2003).
- Mader, SS. Biologie humaine, 1ère edition. Bruxelles : Edition De Boek.(2010).
- Mezzetti, A. Pierdomenico, SD. Costantini, F. Romano, F. De Cesare, D. Cuccurullo, F. Imbataro, T. Riario-sforza, G. Di Giacomo, F. Zuliani, G. Fellin, R. Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *free radical biology medicine journal*. Vol 25(6), pp.676-681. (1998).
- Magder, S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Critical Care Med Journal*, Vol 10, pp. 208-216. (2006).
- Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez, J.C. Parajo, "Natural antioxidants from residual sources", *Food Chemistry*, Vol. 72, , p. 145. (2001).
- Mason, T.J., Lorimer, J.P., *Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Wiley Online Library.(2002).
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS, et al. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *Am J Clin Nutr* 81: 508-514. (2005).
- Mozaffarian D., Ascherio A., Hu F.B, Stampfer M.J, Willett W.C, Siscovick D.S. & Rimm E.B. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 18 :157-164 (2005).
- Muir AD (2006) Flax lignans – analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. *J AOAC Int* 89: 1147-1157.
- Mourot, Le gel de lin, l'allié hydratation indispensable. *ConsoGlobe, consommer mieux-vivre mieux*. le 4 Nov 2017
- Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. p et Canaud, B. Stress oxidant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*. 5 : 201 208 (2002).
- Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 211–219. (2004).
- Nait Sidi Ahmed, A. Mise en place d'un procédé d'extraction et de pré-purification de molécules bioactives à partir d'une culture énergétique «*Salix miyabeana SX67*». *Maitrise en génie chimique*, Université de Sherbrooke, Canada. (2012).
- Oomah, B. D., & Mazza, G. Flaxseed products for disease prevention. In G. Mazza (Ed.). *Functional Foods: Biochemical and processing aspects* (pp. 91–138). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co, Inc. (1997).
- Oomah, B.D., Kenaschuck, E.O., Mazza, G. Phenolic acids in flaxseed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2016-2019. (1995).

- Orban, J. Oxygène, stress oxydant. Désordres métaboliques et réanimation. P 428-435.(2011)
- Prommajak, T., Surawang, S., Rattanapanone, N., Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (Houttuyniacordata Thunb.). Songklanakarin Journal of Science & Technology 36.(2014.).
- Peterson, S. W. Linseed oil meal. dans: *Processed Plant Protein Foodstuffs*. Eds Altschul, A. M., Academic Press, New York, USA pp 539. (1958).
- Pawlowska, A.M., De-leo, M., Braca, A. Phenolics of arbutus unedo L. (Ericaceae) fruits : Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. J Agric Food chem, 54(26) :10234-38 (2006).
- Ph Européenne. Pharmacopée Européenne 8.0- Graine de lin.
- Papas A. M. Vitamin E: A new perspective. *Nutri news*. 9(1): 1-7. (2008).
- Pastre, J.O.C. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 120p. (2005).
- P. Weill, G. Mairesse Valorex, Le lin, son huile, sa graine et notre santé La Messayais, F-35210 Combourville, France . Phytothérapie 8: 1-5 © Springer-Verlag France 2010 DOI 10.1007/s10298-010-0539-8. (2010).
- Pétrier, C ; Gondrexon, N.; Boldo, P. Ultrasons et sonochimie. Dans Techniques de l'ingénieur - Chimie verte : optimisation des modes de séparation, d'activation et de synthèse, référence : AF6310. (2008).
- Pelmont, J. Enzymes. Office des publications universitaires (OPU), (1993).
- Reilly, C. Selenium in food and health, 2ème édition. New York Springer. (2006).
- Lin, G.g. Rowland, L'ENCYCLOPÉDIE CANADIENNE, 23 Avril 2013, dernière modification 4 Mars 2015 .
- Rabetafika, H. N., Van Remoortel, V., Danthine, S., Paquot, M., & Blecker, C. Flaxseed proteins: Food uses and health benefits. International Journal of Food Science and Technology, 46, 221-228. (2011).
- Rezić I., Krstić D., Bokić Lj., Ultrasonic extraction of resins from an historic textile, Ultrasonics Sonochemistry, volume 15, p. 21-24. (2008).
- Sanchez-Madrigo, M.A., Amaya-Guerra, C.A., Quintero-Ramos, A., Nunez-Gonzalez, M.A., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Garzon-Tiznado, J.A., Ultrasound-assisted extraction of fructans from agave (Agave tequilana Weber var. azul) at different ultrasound powers and solid-liquid ratios. Food Science and Technology (Campinas) 37, 261-268. (2017).

- Saletes, i., Gilles , B., blanc-Benon, p., Bera, J.-C., Cavitation ultrasonore générée par une excitation bifréquentielle. (2011).
- Salvant, thèse de Doctorat, Caractérisation des propriétés physicochimiques des matériaux de peintures employés par Van Gogh : les peintures blanches, Université de Sorbonne Pierre et Marie Curie, soutenue en 2012.
- Sen CK, Khanna S, Roy S Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci* 78: 2088-2098. (2006).
- Singh, K.K., Mridula, D., Rehal, J., and Barnwal, P. Flaxseed : a potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 210-222 (2011).
- Société Française d'acoustique. Le livre blanc de l'acoustique en France en 2010 – Chapitre 3 - Ultrasons, édition SFA, p.76-82. (2010).
- Touré A.; Xueming X. Flaxseed Lignans: Source, Bio-synthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. F* 9, 261-269 (2010).
- Tahirfarid, Madad Ali, Muhammad Shafeeq and Inayat Khattak. Response of Community towards Gender Dysphorics .M.Phil scholar sociology department University of Peshawar .M.Phil scholar sociology department Agriculture University Peshawar (2011).
- Wolters, M. Hermann, S. Golf, S. Katz, N. Hahn, A. Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *European Journal of Clinical Nutrition.* Vol 24, pp. 1 - 17. (2005).
- Yaacoub R., Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech). (2009).
- Yang Y. and McClements D. J. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chemistry* 141: 473–481 (2013).
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei R.-J., "Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by Pistacia vera L.: Box-Behnken experimental design", *J. Hazard. Mater.*, 171 ; 551-562, (2009).
- Zhang, W. et al., *Br. J. Nutr.* 99:1301-1309 (2008).
- Zhao, G. et al., *J. Nutr.* 134:2991-2997 (2004).

Annexe

Fiche technique 1

Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

Solutions et tampons utilisés pour la méthode de Bradford

- Réactif de Bradford :
Bleu de Coomassie G 250.....100 mg
Ethanol 95 %.....50 ml
Acide phosphorique 85..... %100 ml
Eau distillée..... compléter à 1000 ml

Filtrer et conserver à l'abri de la lumière, à 4 °C, pendant 1 mois .

- Solution de BSA à 0.1 %
BSA100 mg
Eau distillée100 ml

Le tampon est conservé à l'abri de la lumière, et à +4°C.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو القيام باستخراج البلمر الحيوي (الهلام النباتي) من بذور الكتان باستخدام طريقة الموجات فوق الصوتية، وصفه وتطبيقه كمضاد للأكسدة من أجل تقليص الأكسدة. الجزء التطبيقي يتم إنجازه على مرحلتين مع تطبيق مخطط الخبرة وبالأخص مخطط المساحات. تتمثل الخطوة الأولى في تحسين استخراج الهلام النباتي لبذور الكتان بالاتصال مع اعدادات التشغيل التالية: الكتلة، المدة الزمنية والقدرة. الظروف الأمثل في هذا المخطط مكنت من الحصول على عائد استخراج ما يقرب من 38,4%. تتعلق الخطوة الثانية بتقييم نشاط مضاد الأكسدة للهلام النباتي من خلال اجراء اختبارات جذرية مضادة للجسم، الهلام النباتي المستخرج لديه نشاط مضاد للأكسدة مهم بمقارنته بحمض الاسكوربيك.

الكلمات المفتاحية:

الهلام النباتي، بذور الكتان، الموجات فوق الصوتية، مخطط الخبرة، نشاط مضاد للأكسدة، الأكسدة.

Résumé :

L'objectif de cette étude est d'extraire un biopolymère (le mucilage) à partir des graines de lin par la méthode d'ultrason, le caractériser et de l'appliquer comme antioxydant afin de réduire le stress oxydatif. La partie expérimentale est réalisée en deux étapes, avec application d'un plan d'expérience, particulièrement le plan de surface.

La première étape consiste à l'optimisation de l'extraction du mucilage de grain de lin en lien avec les paramètres opératoire suivant : masse, temps et la puissance de sonicateur. Les conditions optimisées par ce plan ont permis d'obtenir un rendement d'extraction de l'ordre de 38,4%.

La deuxième étape concerne l'évaluation de l'activité antioxydante du mucilage en réalisant des tests anti-radicalaires. Le mucilage extrait possède une activité antioxydante importante en le comparant à celle de l'acide ascorbique.

Mots clés :

Mucilage, graine de lin, ultrason, plan d'expérience, activité antioxydante, stress oxydatif.

Abstract :

The purpose of this study is the extraction of biopolymer (mucilage) from flaxseed by using the ultrasonic, characterize it and apply it as an antioxidant to reduce oxidative stress. The experimental part is accomplished in two phases with the application of the experience plan, especially the area plan.

The first step is to optimize the extraction of the mucilage of flaxseed in connection with the following operating parameters : mass, time and the power of ultrasonic. The optimum conditions in this plan enabled an extract yield of approximately 38.4%.

The second step concerns the evaluation of the antioxidant activity of the mucilage by carrying out anti-free radical tests, the extracted mucilage has an important antioxidant activity by comparing it with that of the ascorbic acid.

Keyword : mucilage, flaxseed, ultrasound, experience plan, antioxidant activity, oxidative stress.